



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

Caracterización molecular y clonamiento de una fosfolipasa A_2 ácida del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* y su relación en la miotoxicidad

TESIS

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología Molecular

AUTOR

Edwin QUISPE CERÓN

ASESOR

Dr. Armando YARLEQUÉ CHOCAS

Lima, Perú

2020



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Quispe, E. (2020). *Caracterización molecular y clonamiento de una fosfolipasa A2 ácida del veneno de la serpiente peruana Bothrops atrox y su relación en la miotoxicidad*. Tesis para optar el título de Magíster en Biología Molecular. Unidad de Posgrado, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Hoja de metadatos complementarios

Código ORCID del autor	—
DNI o pasaporte del autor	10653057
Código ORCID del asesor	0000-0002-8038-2162
DNI o pasaporte del asesor	07649561
Grupo de investigación	TOXIVEN
Agencia financiadora	<p>Perú</p> <p>-CONCYTEC: Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT).</p> <p>E041-2017-02 “Proyecto de investigación básica y aplicada”</p> <p>Contrato N° 168-2017-FONDECYT</p> <p>-Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP)-UNMSM.</p> <p>Programa de proyectos de investigación para grupos de investigación</p> <p>Código: B18100081</p>
Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación	<p>Perú, Lima, Cercado de Lima, UNMSM, Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de biología molecular - Av. Carlos German Amezaga N°375.</p> <p>Latitud: -12.058663099117013</p> <p>Longitud: -77.08236088250705</p> <p>Altitud: 100 metros</p>
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero del 2018 hasta febrero del 2020
Disciplinas OCDE	<p>Bioquímica, Biología molecular</p> <p>https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03</p> <p>Biología celular, microbiología</p> <p>https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.01</p>



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 199v-UPG-FCB-2020

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE
MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR (SUSTENTACIÓN VIRTUAL)**

Siendo las.11:00 horas del día 18 de diciembre de 2020, en Evento Virtual mediante la herramienta MEET de Google, con enlace meet.google.com/quo-doux-wvp, el Jurado de Tesis conformado por:

Dr.	César Augusto Aguilar Puntriano	(Presidente)
Mg.	Giovanna Elizabeth Sotil Caycho	(Miembro)
Dr.	Marcos Alejandro Sulca López	(Miembro)
Dr.	Armando Yarleque Chocas	(Asesor)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitará el señor Bachiller Don **EDWIN QUISPE CERÓN**.

Después de darse lectura al **Expediente N° 199v-UPG-FCB-2020**, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado presenciaron la exposición de la Tesis Titulada:

“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CLONAMIENTO DE UNA FOSFOLIPASA A2 ÁCIDA DEL VENENO DE LA SERPIENTE PERUANA *Bothrops atrox* Y SU RELACIÓN EN LA MIOTOXICIDAD”, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

Universidad del Perú. Decana de América



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: **Bueno** con la nota de 15 (Quince)

A continuación, el Presidente del Jurado de Tesis recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en Biología Molecular, al señor Bachiller **EDWIN QUISPE CERÓN**.

Siendo las 14:10 horas se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, el día viernes 18 del mes de diciembre del año 2020.

.....
Dr. César A. Aguilar Puntriano

Profesor Asociado a T.C.

PRESIDENTE

caguilarp@unbmsm.edu.pe

RENACYT P0003893

.....
Dr. Armando Yarleque Chocas

Profesor Principal T.C.

ASESOR

avarlequec@unmsm.edu.pe

RENACYT P0000073

.....
Mg. Giovanna E. Sotil Caycho

Profesora Asociado a T.P.

.....
Dr. Marcos A. Sulca López

Profesor Auxiliar a T.C.

DEDICATORIA

Dedico la presente tesis en primer lugar con amor a mi madre, Alfonsa Cerón, quien me dio la vida, por su apoyo incondicional en los momentos difíciles y enseñarme que la disciplina, el valor, el trabajo y la constancia permiten conseguir grandes objetivos en la vida. Además, agradecerle por su amor, cariño, respeto y momentos divertidos que he recibido a lo largo de mi vida.

En segundo lugar, la dedico a mis queridos hermanos; Oscar, Wilfredo y Raúl Cerón, con quienes he compartido momentos inolvidables y memorables, los cuales formarán parte de la historia de la familia y perdurarán en la conciencia en tanto recordemos nuestro pasado. Gracias, por haber formado parte de mi vida.

La creación de conocimientos, a través de la ciencia, es uno de los grandes logros hechos por la especie humana, que en algún punto en la línea del tiempo, posiblemente, se conseguirá extender la vida, del mismo modo que una flor es el vehículo en la continuación de la vida en una planta.

Edwin Quispe Cerón.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco al Dr. Armando Yarlequé Chocas por la confianza y oportunidad de formar parte del Laboratorio de Biología Molecular. Sus consejos, conocimientos, críticas y análisis riguroso en los experimentos fueron muy importantes para mejorar cada ensayo durante el desarrollo de la tesis.

La M.Sc. Edith Rodríguez Quispe, por sus conocimiento, consejos, críticas y orden durante cada experimento en la tesis, lo cual fue muy importante.

La Dra. Fanny Lazo Manrique, por sus conocimientos, consejos en momentos difíciles, críticas y disciplina en cada etapa que permitieron un lugar más ameno y agradable para la culminación de la tesis.

Al M.Sc. Gustavo Sandoval Peña, por compartir sus conocimientos, consejos y duras críticas en circunstancias requeridas para la corrección de los experimentos.

Al Dr. Dan Vivas-Ruiz, por compartir sus conocimientos, críticas, consejos y guía en los ensayos más álgidos y complejos durante la tesis.

En segundo lugar, agradecer el financiamiento proporcionado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) a través del contrato N°168-2017 y al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado (VRIP) de la UNMSM (código: B18100081).

A la M.Sc. Carmen Pantigoso, por hacer del LBM un lugar más agradable, ordenado y sencillo de hacer investigación, por sus críticas y análisis riguroso.

A la Dra. Susana Gutiérrez, por permitirme el acceso de su laboratorio de Microbiología, a usar algún equipo que se necesitaba.

Finalmente, a mis compañeros del LBM: Blgo. Alex Proleon, por proporcionar muestras de PLA₂ básica miotóxica, a *Bach*. Daniel Torrejon, por el secuenciamiento, así como a Lorgio, Andres, Jorge, Jordano y Carmen con quienes he compartido grandes momentos de debates e intercambios de conocimientos y experimentos, alrededor de la Ciencia, madre de la razón.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABLAS.....	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES.....	5
2.1. LA SERPIENTE <i>Bothrops atrox</i> “Jergón” EN EL PERÚ	5
2.2. COMPONENTES DEL VENENO.....	6
2.3. FAMILIA DE FOSFOLIPASAS A ₂	8
2.4. FOSFOLIPASAS A ₂ SECRETORAS	10
2.4.1. Definición	10
2.4.2. Mecanismo de acción	11
2.4.3. Características bioquímicas	12
2.4.4. Características moleculares.....	14
2.4.5. Características estructurales.....	18
2.4.6. Efectos biológicos	20
2.5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	23
2.6. MIOTOXICIDAD	24
2.6.1. Definición	24
2.6.2. Envenenamiento	24
2.6.3. Alteración de la estructura en las células musculares.....	24
2.7. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	26
2.8. CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS.....	27
2.8.1. Sistemas de expresión en <i>E. coli</i> y <i>P. pastoris</i>	27
2.8.2. Sistema de expresión en <i>P. pastoris</i>	28

2.8.3.	Cepas y fenotipos	30
2.8.4.	Vector de expresión	30
2.8.5.	Integración del vector al genoma de <i>P. pastoris</i>	32
2.9.	CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE TOXINAS.....	33
III.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	35
3.1.	HIPÓTESIS.....	35
3.2.	OBJETIVOS.....	35
3.2.1.	Objetivo general	35
3.2.2.	Objetivos específicos	35
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1.	MATERIALES	36
4.1.1.	Materiales biológicos.....	36
4.1.2.	Materiales de laboratorio	37
4.2.	METODOLOGÍAS.....	41
4.2.1.	Extracción del veneno de <i>Bothrops atrox</i> “Jergón de la selva”	41
4.2.2.	Purificación de la enzima BaPer-PLA _{2a}	41
4.2.3.	Cuantificación de proteínas.....	42
4.2.4.	Actividad enzimática	44
4.2.5.	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE).....	44
4.2.6.	Actividad mitotóxica	45
4.2.7.	Caracterización molecular.....	45
4.2.8.	Análisis bioinformático.....	50
4.2.9.	Análisis filogenético de la BaPer-PLA _{2a}	50
4.2.10.	Clonamiento de PLA _{2a} en <i>E. coli</i> (Top10F´).....	51
4.2.11.	Expresión de rPLA _{2a} en <i>Pichia pastoris</i>	60

V.	RESULTADOS.....	63
5.1.	PURIFICACIÓN DE LA BaPer-PLA _{2a}	63
5.2.	DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR SDS- PAGE	65
5.3.	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	66
5.4.	ACTIVIDAD MIOTÓXICA	67
5.5.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR	67
5.6.	ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	69
5.6.1.	Análisis del gen de la BaPer-PLA _{2a}	69
5.6.2.	Análisis de la secuencia BaPer-PLA _{2a}	69
5.6.3.	Alineamiento múltiple de la BaPer-PLA _{2a}	70
5.6.4.	Modelamiento estructural de la BaPer-PLA _{2a}	73
5.6.5.	Análisis filogenético de la BaPer-PLA _{2a}	74
5.7.	CLONAMIENTO DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pPicZαA-rPLA _{2a} EN <i>E. coli</i> 76	
5.7.1.	Construcción del vector de expresión	76
5.7.2.	Transformación de Top10F' por choque térmico	76
5.7.3.	PCR de colonias transformantes de Top10F'	77
5.7.4.	Purificación del plásmido recombinante	78
5.8.	EXPRESIÓN DEL VECTOR pPicZαA-rPLA _{2a} EN <i>P. pastoris</i>	79
5.8.1.	Linealización del vector pPicZαA-rPLA _{2a} con la enzima de restricción <i>PmeI</i>	79
5.8.2.	Transformación de la cepa GS115 por electroporación	80
VI.	DISCUSIÓN.....	81
6.1.	AISLAMIENTO DE LA BaPer-PLA _{2a} DE <i>B. atrox</i>	81
6.2.	CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA	85
6.3.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA.....	87
6.4.	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTRUCTURAL.....	90

6.5.	ANÁLISIS FILOGENÉTICO	94
6.6.	CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE LA rPLA _{2a}	95
VII.	CONCLUSIONES	98
VIII.	RECOMENDACIONES	99
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100
X.	ANEXOS	115
10.1.	Preparación de medios para <i>Escherichia coli</i> y <i>Pichia pastoris</i>	115
10.2.	Producción de proteínas recombinantes usando a <i>P. pastoris</i>	116
10.3.	Guía de principios internacionales para el uso de animales en investigación Biomédica (CIOMS, 1985).....	117

ABREVIATURAS

PLA ₂	Fosfolipasa A ₂
BaPer-PLA _{2a}	<i>Bothrops atrox</i> Perú fosfolipasa A ₂ ácida
rPLA _{2a}	Fosfolipasa A ₂ ácida recombinante
A E	Actividad enzimática
U/mg	Unidades de actividad específica por miligramo
INS	Instituto Nacional de Salud
kDa	Kilo-dalton
mg	Miligramos
mL	Mililitro
NaCl	Cloruro de sodio
ng	Nanogramo
µg	Microgramo
µL	Microlitro
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
NGC TM	Cromatografía de próxima generación
MPLC	Cromatografía líquida de presión media
ENrichQ TM	Columna de intercambio aniónico
PSA	Persulfato de amonio
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBE	Tris-borato-EDTA
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEMED	N,N,N,N'-tetrametiletilendiamina
Tris	Tris hidroximetilaminometano
UTA	Unidades totales de actividad
YPD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa
Low Salt LB	Luria Bertani (triptona, extracto de levadura, NaCl) bajo en sal
YPDS+Z	Extracto de levadura, peptona, dextrosa, sorbitol y zeocina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>EcoRI</i>	Enzima de restricción aislada de <i>Escherichia coli</i>
<i>PmeI</i>	Enzima de restricción aislada de <i>Pseudomonas mendocina</i>
<i>SalI</i>	Enzima de restricción aislada de <i>Streptomyces albue</i>

nM	Nanomolar
M	Molar
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CK	Creatina quinasa (Creatine kinase)
DTT	Ditiotreitol
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
RNA _t	Ácido ribonucleico total (Ribonucleic acid total)
AOX1	Alcohol oxidasa 1
DO (600 nm)	Densidad óptica a 600 nanometros
Sh ble	Gen de resistencia a Zeocina aislado de (<i>Streptoalloteichus hindustanus</i> gen ble)
Å	Angstrom
g	Gramos
s	Segundos
h	Hora
rpm	Revoluciones por minuto
g	Fuerza centrifuga relativa (fuerza g)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del Perú con casos de ofidismo	6
Figura 2. Estudio proteómico de <i>B. atrox</i>	8
Figura 3. Mecanismo catalítico de la PLA ₂	12
Figura 4. Estructura de PLA ₂ secretora del subgrupo IIA.....	16
Figura 5. Árbol filogenético de fosfolipasa A ₂	17
Figura 6. Estructura de una PLA ₂ ácida hipotensiva.....	19
Figura 7. Esquema del daño al tejido local muscular.....	26
Figura 8. Vía metabólica del metanol en <i>Pichia pastoris</i>	29
Figura 9. Mapa del vector de expresión pPicZαABC.....	31
Figura 10. Integración del vector de expresión al genoma de <i>P. pastoris</i>	32
Figura 11. Serpiente de <i>Bothrops atrox</i> de Perú.....	36
Figura 12. Sistema cromatográfico líquido de presión media (MPLC).....	43
Figura 13. Características del vector pPicZαA	54
Figura 14. Esquema del clonamiento de la PLA ₂ ácida	57
Figura 15. Esquema de preparación de células competentes (cepa KM71H).....	61
Figura 16. Cromatogramas de purificación.....	64
Figura 17. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	65
Figura 18. Actividad enzimática de BaPer-PLA _{2a}	66
Figura 19. Actividad creatina quinasa (CK) de BaPer-PLA _{2a}	67
Figura 20. Amplificación de la BaPer-PLA _{2a} nativa por PCR.....	68
Figura 21. Marco de lectura abierta (ORF).....	69
Figura 22. Secuencia completa del cDNA y su traducción a aminoácidos.....	70
Figura 23. Alineamiento múltiple de BaPer-PLA _{2a}	72
Figura 24. Modelo teórico estructural de BaPer-PLA _{2a}	73
Figura 25. Diagrama Ramachandran de la BaPer-PLA _{2a}	74
Figura 26. La historia evolucionaria de la BaPer-PLA _{2a}	75
Figura 27. Alineamiento simple de la rPLA _{2a} y BaPer-PLA _{2a}	76
Figura 28. Transformantes de <i>E. coli</i> , cepa Top10F'	77
Figura 29. PCR de colonias transformantes de Top10F'	78
Figura 30. Purificación del plásmido recombinante.....	79
Figura 31. Linealización del plásmido recombinante.....	80
Figura 32. Transformante de GS115 por electroporación	81

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. La familia de PLA ₂ secretoras	10
Tabla 2. Características de las isoformas de PLA ₂ ácidas	22
Tabla 3. Lista de cebadores de la PLA ₂ ácida nativa	46
Tabla 4. Reactivos para la RT-PCR.....	48
Tabla 5. Etapas y condiciones de RT-PCR	48
Tabla 6. Reactivos y concentraciones para la PCR	49
Tabla 7. Etapas y condiciones de la PCR.....	49
Tabla 8. Lista de cebadores para el clonamiento.....	51
Tabla 9. Reactivos y concentraciones para la PCR de clonamiento	52
Tabla 10. Etapas y condiciones de PCR para el clonamiento.....	52
Tabla 11. Reactivos y concentración en la digestión de la PLA ₂ ácida	53
Tabla 12. Reactivos y concentración en la digestión del plásmido.....	54
Tabla 13. Reactivos para la ligación del gen y plásmido	55
Tabla 14. Reactivos para la PCR de colonia... ..	58
Tabla 15. Etapas y condiciones de la PCR de colonia... ..	58
Tabla 16. Reactivos en la linealización del plásmido recombinante	60
Tabla 17. Recuperación y rendimiento de la BaPer-PLA ₂ a... ..	65
Tabla 18. Cuantificación del RNA total y cDNA.....	68
Tabla 19. Cuantificación del plásmido recombinante... ..	78

RESUMEN

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) del veneno de las serpientes, son enzimas con una variedad de efectos biológicos, los cuales son atribuidos a sus diferentes isoformas ácidas y básicas. Algunas son: anticoagulantes, miotóxicas o neurotóxicas, siendo la miotoxicidad uno de los efectos más graves. Además, el clonamiento y expresión de una proteína recombinante es una herramienta importante para entender la estructura-función de una proteína, por ello, el objetivo de la presente investigación fue purificar, caracterizar y evaluar la actividad miotóxica de una isoforma nativa de PLA₂ ácida (denominado BaPer-PLA_{2a}) de *B. atrox* así como clonar y expresar su forma recombinante. Para ello, se purificó la proteína nativa en tres pasos cromatográficos usando DEAE-Sephadex-A50, Sephadex-G75 y un sistema cromatográfico automatizado líquido de presión media (MPLC). La enzima BaPer-PLA_{2a} tuvo una actividad específica de 34.1 U/mg y un peso molecular de ~14.5 kDa por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Asimismo, se aisló el RNA total para la síntesis de cDNA y se obtuvo una longitud de 372 pb. Se dedujo de la secuencia de cDNA una proteína madura de 124 aminoácidos con un pI teórico de 4.41, evidenciando una isoforma ácida. La estructura primaria de esta proteína presenta regiones conservadas en el centro catalítico His48, Asp99, Tyr73 y Tyr52, en el *loop* de unión al Ca²⁺ Tyr28, Gly30, Gly32 y Asp49 y la presencia de siete enlaces disulfuro, perteneciendo por tanto a la clase D49PLA₂. El modelo teórico estructural de la isoforma tiene una homología del 76.5 % con la PLA₂ ácida de *B. jararacussu* (PDB: 1U73.1A). Asimismo, la BaPer-PLA_{2a} no presenta actividad miotóxica, no obstante, al combinarla con la isoforma de PLA₂ básica incrementó la actividad de esta última en 21.58 %. Adicionalmente, el gen fue insertado en el vector pPicZαA y se usó para la transformación y propagación a *Escherichia coli*, cepa Top10F', llegando a obtener un inserto de rPLA_{2a} de ~500 pb lo que indica que el clonamiento fue exitoso. Por otro lado, se usó a *Pichia pastoris* cepa GS115 en los ensayos de expresión de la proteína recombinante, lo cual no se evidenció debido a la optimización en algunos parámetros.

Palabras claves: *Bothrops atrox*, veneno, purificación, miotoxicidad, clonamiento, fosfolipasa A₂ ácida.

ABSTRACT

The phospholipases A₂ (PLA₂) from snake venom are enzymes with a variety of biological effects, which are attributed to their different acid and basic isoforms, some are: anticoagulant, myotoxic or neurotoxic. Also, the cloning and expression of recombinant protein are important tools for a better understanding of the structure-function of a protein. The myotoxicity is one of the most dangerous effects, for this reason, the aim of this research was to purify, characterize and evaluate the myotoxic activity of a native isoform of acid PLA₂ (called BaPer-PLA_{2a}) of *B. atrox* as well as to clone and express its recombinant form. Thus, the native protein was purified in three chromatographic steps: in DEAE Sephadex-A50, Sephadex-G75 and medium pressure liquid chromatographic system (MPLC). The BaPer-PLA_{2a} enzyme had a specific activity of 34.1 U/mg and a MW of ~14.5 kDa by SDS-PAGE under non-reducing conditions. Total RNA was isolated, for the synthesis of cDNA and a length of 372 pb was obtained. The cDNA was deduced a mature protein of 124 amino acids with a theoric *pI* (4.41), showing an acid isoform. Also, presented a primary structure with conserved regions, in catalytic center His48, Asp99, Tyr73 and Tyr52, an Ca²⁺-bind loop Tyr28, Gly30, Gly32 and Asp49 and seven disulfide links, therefore all included into class D49PLA₂. The theoretical structural model has an identity of 76.5 % with acidic PLA₂ of *B. jararacussu* (1U73.1A). BaPer-PLA_{2a} does not present myotoxic activity, however, when combined with the basic PLA₂ isoform, it increased the myotoxin activity of the latter about 21.58 %. Additionally, the gene was inserted into the vector pPicZαA and was used for the transformation and propagation to *Escherichia coli*, Top10F' strain, obtaining an insert of rPLA_{2a} of ~500 bp, indicating that the cloning was successful. On the other hand, *Pichia pastoris* strain GS115 was used for expression assays of the recombinant protein, which did not show any evidence due to optimization in some parameters

Keywords: *Bothrops atrox*, venom, purification, myotoxicity, cloning, acidic phospholipase A₂

I. INTRODUCCIÓN

En el año 2017, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó que anualmente 5,4 millones de personas sufren mordeduras de serpientes, produciéndose entre 81 y 137 mil muertes y otras discapacidades permanentes. Por tal motivo, la OMS incluyó el envenenamiento por mordeduras de serpientes entre las enfermedades tropicales desatendidas, lo que significa que su atención es prioritaria ya que no solo conduce a pérdidas de vidas humanas, sino que también es un problema de salud pública; del mismo modo, causan pérdidas en la producción laboral en diferentes sectores, especialmente en el sector salud y en las comunidades nativas. La situación puede conducir a circunstancias en las cuales no se pueda controlar ni tratar a las víctimas, si no se cuenta con los antivenenos necesarios y específicos en los lugares donde estadísticamente ocurren envenenamiento por mordedura de serpientes.

En el Perú se encuentran diversas serpientes venenosas, tales como: *Micrurus mertensi*, *Crotalus durissus*, *Bothrops brazili*, *Micrurus filiformis*, *Bothrops neuwiedi*, *Bothriopsis bilineata* y entre otras más. En tanto que, en la familia Viperidae se pueden mencionar algunas serpientes, tales como: *Lachesis muta*, *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops atrox*. Estos animales se encuentran en la selva, sierra y costa, en diferentes departamentos, algunos son: Loreto, Ucayali, Huánuco, San Martín, Lima y Junín. Sin embargo, la región con más casos de accidente ofídicos es en los departamentos de Loreto, San Martín y Amazonas. Las serpientes que causan más ofidismo en la selva alta y baja pertenecen al género *Bothrops* (Navarrete *et al.*, 2010; MINSA, 2019). Entre el 2014 y 2019, el 77.2 % de los casos de envenenamiento por mordedura de serpientes fueron reportados principalmente en los departamentos de Loreto, Amazonas, Ucayali, San Martín y Huánuco (MINSA, 2019).

Durante el envenenamiento se pueden observar diversos efectos biológicos, tales como: mionecrosis, neurotoxicidad, miotoxicidad, hemorragia, edema, hipotensión, incoagulabilidad, inhibición de la agregación plaquetaria y citotoxicidad (Gutiérrez y Rucavado, 2000; Kini, 2003; Lomonte y Gutiérrez, 2011). Estos daños se pueden evidenciar a nivel local o sistémico causados principalmente por las enzimas

metaloproteasas y fosfolipasas A₂ (Gutiérrez y Ownby, 2003; Gutiérrez *et al.*, 2009). El veneno es una mezcla de componentes muy sofisticada en el mundo natural, que ha servido a las serpientes, para no solo defenderse de su depredador, sino capturar y digerir a su presa (Fry y Wuster, 2004; Fry *et al.*, 2008).

Por otra parte, en el veneno hay una variedad de toxinas, las cuales presentan características diferentes en cuanto a su peso molecular, punto isoelectrico, estructura y propiedades biológicas, asimismo pueden ser péptidos y proteínas con o sin actividad enzimática. Así tenemos a las metaloproteasas, serinoproteasas, fosfolipasas A₂, L-aminoácido oxidasas, hialuronidasas, lectina tipo-C, CRISP, desintegrinas, acetilcolinesterasas, factor de crecimiento endotelial vascular y nervioso e inhibidor de proteasas tipo kunitz (Fry and Wuster, 2004; Calvete *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2011; Kohlhoff *et al.*, 2012). La investigación sobre estas toxinas es importante para desarrollar antivenenos específicos contra cada toxina para inhibir el progreso del envenenamiento, también, presenta una gran importancia en el desarrollo de herramientas de diagnóstico y drogas de importancia clínica, así lo muestra un estudio en venómica sobre diferentes serpientes (Calvete *et al.*, 2007).

Las fosfolipasas A₂ (PLA₂) son enzimas que catalizan la hidrólisis de fosfolípidos presentes en el veneno de diferentes serpientes incluyendo al ser humano, las cuales se han investigado muy ampliamente (Scott *et al.*, 1990; Dennis *et al.*, 2011; Kini, 2003). En el Perú, la investigación sobre la toxina fosfolipasa A₂ en serpientes como: *Crotalus durissus*, *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* han empezado hace algunas décadas atrás purificándola y evaluando su actividad enzimática (Lazo *et al.*, 1998), una miotoxina con alto contenido en abundancia en el veneno de *B. brazili* (Pantigoso *et al.*, 2002). Posteriormente, Huatuco *et al.* (2004) caracterizó una fosfolipasas A₂ del veneno de *B. atrox* con actividad enzimática y miotóxica. Luego, se purificó y caracterizó a nivel bioquímico otras PLA₂ de diferentes serpientes como *L. muta* (Mejia *et al.*, 2006; Inga *et al.*, 2010), se clonó y caracterizó *in silico* en *L. muta* (Jimenez *et al.*, 2010). También, se realizó un estudio proteómico de tres serpientes peruanas como en: *B. pictus*, *B. barnetti* y *B. atrox*, confirmándose que las fosfolipasas A₂ son el segundo componente en abundancia en el veneno de estas serpientes (Kohlhoff *et al.*, 2012).

Esta enzima PLA₂ secretora se caracteriza por ser de bajo peso molecular, entre 13-18 kDa (Six y Dennis, 2000; Dennis *et al.*, 2011; Calvete *et al.*, 2007; Kohlhoff *et al.*, 2012) y presenta múltiples isoformas, pudiendo ser ácidas o básicas, las mismas que presentan diversos efectos biológicos, tales como: neurotóxica, miotóxica, anticoagulante, hipotensora, edemática, citotóxica, inhibidora de agregación plaquetaria, bactericida y causante de daño a varios tejidos, siendo el más grave, la miotoxicidad. Algunos estudios señalan que puede haber sinérgismo entre una isoforma ácida y básica para potenciar la miotoxicidad y otras acciones biológicas (Gutiérrez y Ownby, 2003; Kini, 2003; Lomonte y Gutiérrez, 2011; Mora-Obando *et al.*, 2014). La isoforma de PLA₂ básica es la más miotóxica, en tanto que la isoforma ácida es la menos miotóxica o carente de esta acción (Lomonte y Gutierrez, 2011). Sin embargo, hay trabajos donde han encontrado la isoforma de fosfolipasa A₂ ácida con acción miotóxica (Cogo *et al.*, 2006; Posada *et al.*, 2017).

Por otro lado, el modelo estructural teórico de la isoforma de PLA₂ ácida realizado con herramientas bioinformáticas, puede abrir caminos a un mayor entendimiento en relación a la estructura-función de la enzima, durante el envenenamiento. Así, los residuos de aminoácidos que participan directamente en el mecanismo de acción de la PLA₂, en la catálisis de hidrólisis de fosfolípidos, es la histidina 48 (His48) actuando en el centro activo e iniciando el secuestro de un protón (H⁺) de la molécula de agua en la hidrólisis y el ácido aspártico 49 (Asp49) que al unirse al ion calcio (Ca²⁺) estabilizan al fosfolípido, lo cual conduce al colapso del intermedio tetraédrico y da lugar a la formación de los productos ácido graso y lisofosfolípido (Verheij *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 1990; Magro *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006). En la familia Viperidae la estructura de la enzima presenta regiones altamente conservadas dentro del subgrupo IIA, tiene siete enlaces disulfuro, un centro catalítico, un loop de unión al calcio, tres α -hélices y una hoja- β (β -wing). Dentro del subgrupo hay dos clases: las Asp49 (D49PLA₂) y Lys49 (K49PLA₂) (Arni y Ward, 1996; Magro *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2011; Lomonte, 2012).

La purificación e identificación de una proteína requiere previamente una serie de etapas, lo cual demanda tiempo y costo. No obstante, la tecnología de clonamiento y expresión de la proteína recombinante facilita en gran medida este proceso. La expresión de proteínas heterólogas en sistemas bacterianos, tal como *E. coli*, ha

sido ampliamente usada en décadas pasadas por muchos investigadores (Cole, 1996), aunque presenta problemas con respecto a las modificaciones postraduccionales, mientras que, en el sistema eucariota, utilizando a la levadura *Pichia pastoris*, se han expresado 5000 proteínas recombinantes de acuerdo a la web www.pichia.com (Cregg *et al.*, 2000; Cerenghino y Cregg, 2000; Jan-Philipp *et al.*, 2017). La expresión en *P. pastoris* tiene varias ventajas con respecto a las modificaciones postraduccionales, formación de enlaces disulfuro, plegamiento y procesamiento proteolítico, además de conservar la funcionalidad (Higgins y Cregg, 1998; Cerenghino y Cregg, 2000). Hay dos factores que hacen importante el sistema de expresión en *P. pastoris*, primero, no utiliza como fuente de carbono a la glucosa y produce una alta densidad celular y segundo, tiene la habilidad de crecer en un medio con metanol como fuente de carbono y energía, para ello cuenta con dos enzimas, la alcohol oxidasa (AOX) y la dihidroxiacetona sintasa (DHAS) (Cregg *et al.*, 1989; Cregg *et al.*, 2000; De Shutter *et al.*, 2009). La cepa GS115 (Cregg *et al.*, 1985) y KM71H (Tschopp *et al.*, 1987), presentan mutaciones por lo cual requieren de distintas concentraciones de metanol para inducir la expresión de la proteína foránea.

Dentro de este panorama, la presente investigación estuvo enfocada en aislar a la primera isoforma de PLA₂ ácida (denominada BaPer-PLA_{2a}) del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox*, conocer algunas de sus propiedades bioquímicas, moleculares y estructurales, para posteriormente clonar y expresar su forma recombinante y fundamentalmente entender su relación con la actividad miotóxica, lo cual tiene gran importancia en investigación básica y clínica, teniendo en cuenta que este efecto biológico es el más peligroso durante el envenenamiento y el menos sensible a la neutralización con el antiveneno comercial. Asimismo, el hecho de poder clonar y expresar a la toxina abre el camino para una mejor caracterización estructural y biofísica de la proteína para entender con mayor precisión sus efectos biológicos.

II. ANTECEDENTES

2.1. LA SERPIENTE *Bothrops atrox* “Jergón” EN EL PERÚ

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en junio de 2017, reporta que cada año 5,4 millones de personas sufren mordeduras de serpientes. Por tal motivo, la OMS incluyó el envenenamiento por mordeduras de serpientes entre las enfermedades tropicales desatendidas más prioritarias. En el clado Serpentes de ofidismo hay serpientes venenosas y no venenosas. Por lo general, las presas de las serpientes venenosas o no venenosas son roedores, mamíferos pequeños y grandes, ratones, conejos y algunas aves (Yarlequé, 2000). La dieta de las serpientes, de algún modo, permite controlar la sobrepoblación de dichos roedores, lo cual es importante, ya que los mismos podrían transmitir alguna enfermedad al hombre.

En el Perú existen aproximadamente 33 serpientes. Las serpientes venenosas pertenecen a las familias Viperidae y Elapidae, mientras que las no venenosas están incluidas en la familia Boideae. Algunas de las especies venenosas son; *Bothrops pictus*, *Bothrops barnetti*, *Lachesis muta*, *Bothrops atrox*, *Crotalus durissus*, *Micrurus mertensi*, *Bothrops brazili*, *Bothrops roedingeri* y otras especies. Las especies pertenecientes al género *Bothrops* sp. son las más peligrosas y causan numerosos envenenamientos por mordedura de serpientes (Malaga *et al.*, 2000; Navarrete *et al.*, 2010; Inga *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2012), mientras que la especie *Bothrops atrox* conocida comúnmente como “Jergón de la selva”, presenta el más alto índice de accidentes ofídicos en la selva alta y baja del país (Navarrete *et al.*, 2010; MINSA, 2019). Asimismo, el MINSA (2019), reportó que entre los años 2014 hasta el 2019, se han tenido un 77.2 % de los casos de ofidismo que corresponden a cinco departamentos; Loreto, Amazonas, San Martín, Huánuco y Ucayali (figura 1).

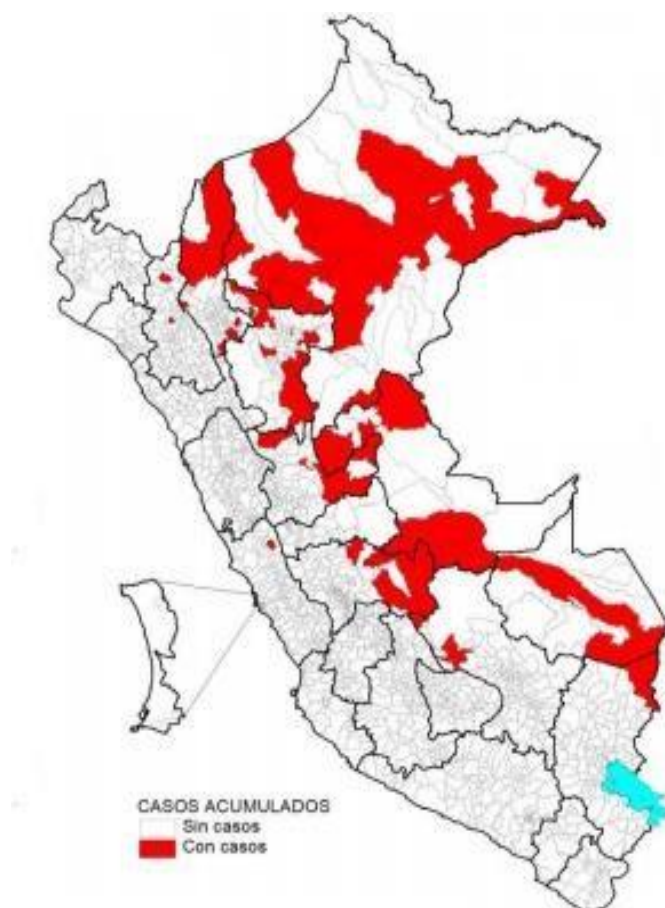


Figura 1. Mapa del Perú con casos de ofidismo. Se muestran a 74 distritos con al menos un caso reportado de ofidismo (Fuente: MINSA, 2019)

Por otro lado, el Instituto Nacional de Salud (INS) en el Perú, se encarga de producir los antivenenos monovalentes contra la especie *Crotalus durissus terrificus* y *Lachesis muta*, en tanto que el antiveneno polivalente son contra varias especies del genero *Bothrops*. Este último antiveneno, hace falta algo más de investigación para neutralizar al veneno por especie ya que el mismo presenta diferentes toxinas y de acuerdo a su edad y zona geográfica hay variaciones en su efecto biológico (Malaga *et al.*, 2000; Ortiz *et al.*, 2012).

2.2. COMPONENTES DEL VENENO

El veneno de las serpientes es una secreción muy compleja, producidos por glándulas especializadas. Hay variaciones en sus componentes, según la familia, género, especie y subespecie. Esto es debido en gran medida a su distribución

geográfica, edad, hábitat, sexo y dieta (Chippaux *et al.*, 1991; Mackessy, 2010). En el veneno hay diversos componentes, los cuales pueden ser: las familias de Metaloproteasas (SVMPs), Serina proteinasas similar a trombina, (SVSPs), Nucleasas, fosfomonoesterasas, fosfolipasas A₂ (PLA₂), acetilcolinesterasas, L-aminoácido oxidasas (LAAO), hialuronidasas, toxinas tres dedos (3FTx), fasciculinas, proteínas secretoras ricas en cisteínas (CRISP), desintegrinas, lectinas tipo-C, factor de crecimiento nervioso (NGF), cistatinas y miotoxinas. Todos estos componentes hacen del veneno un arma sofisticada para la sobrevivencia y diversificación exitosa en el mundo natural (Fry y Wuster, 2004; Fry, 2008; Calvete *et al.*, 2007; Mackenssy, 2010; Kohlhoff *et al.*, 2012). Asimismo, basado en un estudio venómico, se determinó que los componentes del veneno entre diferentes serpientes, varía en cantidad y presencia, aunque hay toxinas en mayor abundancia presente en todas las serpientes, como las: SVMPs, SVSPs, PLA₂, LAAO y Lectina tipo-C (Calvete *et al.*, 2007). El veneno puede generar múltiples efectos biológicos, tales como; mionecrosis, miotoxicidad, neurotoxicidad, hipotensión, citotoxicidad, edemá, hemorragia y entre otras mas (Gutierrez y Ownby, 2003; Kini, 2003; Rodrigues *et al.*, 2004; Kini, 2005; Lomonte y Gutierrez, 2011; Mora-Obando *et al.*, 2014).

Por tal razón, en el país se desarrollaron diversas investigaciones con diferentes serpientes con el objetivo de entender sus propiedades y caracterizar las toxinas que participan en los efectos biológicos. Kohlhoff *et al.* (2012), hicieron un estudio proteómico realizado a tres serpientes peruanas; *Bothrops atrox*, *Bothrops barnetti* y *Bothrops pictus*, concluyeron que la SVMPs, SVSPs y PLA₂ son los principales componentes del veneno (Figura 2). Uno de las primeras investigaciones en serpientes peruanas fue en *Crotalus durissus*, *Bothrops brazili*, *Lachesis muta* y *Bothrops atrox* caracterizando a la fosfolipasa A₂ (PLA₂) desarrollando métodos de purificación y medición de actividad enzimática de la enzima PLA₂ (Lazo *et al.*, 1998), asimismo la composición proteica en *B. atrox* (Malaga *et al.*, 2000). Posteriormente, se aisló y caracterizó a la primera miotoxina en *B. brazili* (Pantigoso *et al.*, 2001; 2002) y se caracterizó a la PLA₂ del veneno de las serpientes de *B. atrox* (Huatuco *et al.*, 2004; Ortiz *et al.*, 2012) y *L. muta* (Mejía *et al.*, 2006; Jiménez *et al.*, 2010; Inga *et al.*, 2010).

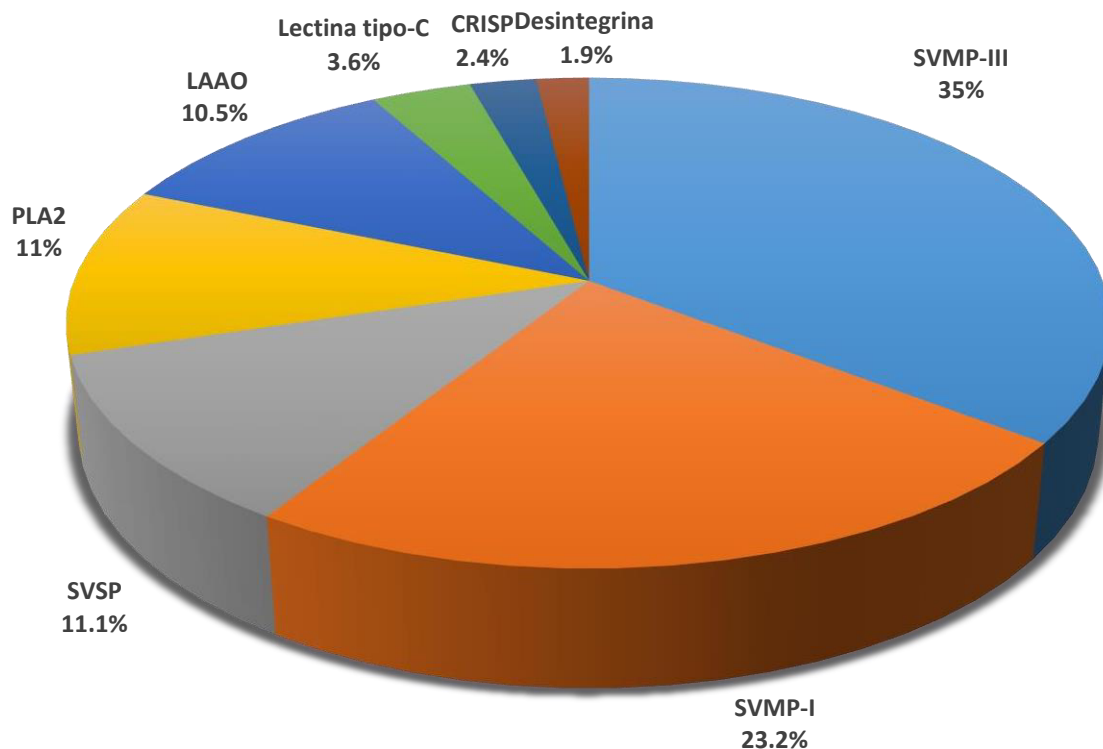


Figura 2. Estudio proteómico del veneno de la serpiente peruana *Bothrops atrox* (adaptado de Kohlhoff *et al.*, 2012).

2.3. FAMILIA DE FOSFOLIPASAS A₂

Las familias de fosfolipasas A₂ (PLA₂), (EC 3.1.1.4), son enzimas que están presentes en diversos organismos como, por ejemplo: escorpiones y serpientes. Las PLA₂ son una superfamilia constituidas por diferentes tipos o familias de PLA₂, por lo mismo se desarrolló cuatro criterios para clasificar, agrupar en grupos y subgrupos, los cuales se basan en: 1) criterio esencial, es la catálisis de hidrólisis en los fosfolípidos en el enlace éster sn-2, 2) es la secuencia completa de aminoácidos de la proteína madura para estar en un grupo, 3) el tercer criterio es la identificación de secuencias homólogas del gen de PLA₂ dentro de una misma especie (parálogos) para incluirlos en un subgrupo con letras (A,B,C,D etc.) y el 4) es la variación *splicing* activa del mismo gen para sintetizar distintas proteínas, deben asignarse con números arábigos dentro de un subgrupo (1,2,3,4, etc.) (Six

and Dennis, 2000). Por lo que se han clasificado a las PLA₂ en once grupos (I-XI) (Six and Dennis, 2000). Posteriormente, se clasificó en quince grupos (I-XV), y cinco tipos de PLA₂, basados en su mecanismo catalítico, característica estructural y funcional (Schaloske and Dennis, 2006). Sin embargo, se incluiría un sexto tipo o familia de PLA₂ dentro de las superfamilias (Dennis *et al.*, 2011)

Las familias o tipos de fosfolipasas A₂ son: fosfolipasas A₂ secretoras (sPLA₂), fosfolipasas A₂ citosólicas (cPLA₂), fosfolipasas A₂ independientes de Ca⁺² (iPLA₂), factor activador plaquetario acetilhidrolasas (PAF-AH), fosfolipasas A₂ lisosomal (LPLA₂) y un nuevo tipo aislado en tejido adiposo, adiposo-PLA₂ (AdPLA₂) (Six and Dennis, 2000; Schaloske and Dennis, 2006; Dennis *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2011). La familia o tipo de sPLA₂ está constituido por 10 grupos: GI, GII, GIII, GV, GIX, GX, GXI, GXII, GXIII y GXIV. Además, el GII está formado por seis subgrupos; GIIA, GII B, GII C, GII D, GII E y GII F, justamente las serpientes de la familia Viperidae están presentes en el grupo IIA (GIIA). La familia cPLA₂ esta presente solo en el GIV y las iPLA₂ en el GVI, en tanto que las PAF-AH en los grupos GVII y GVIII. Finalmente, las familias LPLA₂ y AdPLA₂ estan en los grupos GXVI y GXV, respectivamente (Six and Dennis, 2000; Schaloske and Dennis, 2006; Dennis *et al.*, 2011; Murakami *et al.*, 2011)

Las fosfolipasas A₂ secretoras (sPLA₂) del GIA y GIIA han sido encontradas en numerosas serpientes de la familia Elapidae y Viperidae, respectivamente (Doley *et al.*, 2010; Lomonte y Gutiérrez, 2011). Las sPLA₂ de GIIA, son proteínas de bajo peso molecular (13-15 kDa), presentan 7 enlaces disulfuro, un único enlace disulfuro en la posición del residuo 50-133, tiene una extensión C-terminal constituido por 5-7 residuos de aminoácidos, un centro catalítico y requieren ion calcio (Ca²⁺) (Six y Dennis, 2000; Schaloske and Dennis, 2006; Calvete *et al.*, 2007), aun que se ha encontrado pesos moleculares entre (13-17kDa) (Dennis *et al.*, 2011). Además, las sPLA₂ están presentes en el hombre en diferentes tejidos, localizados en macrófagos, acrosoma del espermatozoide, hígado, células sinoviales, glándula gástrica, epitelio alveolar, miocardiositos y células dendríticas, los cuales participan en el desarrollo de diversas funciones fisiológicas (Tabla 1) (Murakami *et al.*, 2011).

Grupo	Fuente	Masa molecular (kDa)	Enlace disulfuro
IA	Cobras y búgaros	13-15	7
IB	Pancreas porcino/humano	13-15	7
IIA	Serpientes de cascabel ; Sinovial humano	13-15	7
IIB	Vibora del gabon	13-15	6
IIC	Testículo de murino/rata	15	8
IID	Bazo/pancres de murino/humano	14-15	7
IIE	Utero/corazon/cerebro de murino/humano	14-15	7
IIF	Embrion/testiculo de murino/humano	16-17	6
III	Abeja/lagartija/murino/humano	15-18 55(humano/murino)	8
V	Macrófago/pulmón/corazón de murino/humano	14	6
IX	Veneno de caracol (conodipina-M)	14	6
X	Leucocito/timo/bazo de humanos	14	8
XIA	Brotes de arroz verde (PLA ₂ - I)	12.4	6
XIB	Brotes de arroz verde (PLA ₂ - II)	12.9	6
XII	Murino/humano	19	7
XIII	Parvovirus	<10	0
XIV	Simbiótica de hongo/bacteria	13-19	2

Tabla 1. La familia de fosfolipasas A₂ secretoras (Adaptado de Schaloske and Dennis, 2006)

2.4. FOSFOLIPASAS A₂ SECRETORAS

2.4.1. Definición

Las fosfolipasas A₂ secretoras (sPLA₂), (E.C. 3.1.1.4), son enzimas catalíticas que hidrolizan al sustrato fosfolípido en la interfase agua-lípido (Berg *et al.*, 2001). Los fosfolípidos pueden formar agregados como: micelio, monocapas, vesículas o membranas celulares (Scott *et al.*, 1990). Los productos formados son el ácido graso (ácido araquidónico), el cual participa en la producción de eicosanoides (prostaglandinas y leucotrienos) y lisofosfolípidos, los cuales participan en diversos

niveles fisiológicos, tales como; conducción en la señalización, procesos inflamatorios o antiinflamatorios, remodelación de la membrana, lípidos surfactantes, defensa antimicrobiana y reproducción (Murakami *et al.*, 2011). Para dicha catálisis, requieren moléculas de agua y el ion calcio (Ca^{2+}) (Scott *et al.*, 1990). El nombre de fosfolipasa A_2 , es por la actividad hidrolítica sobre el enlace éster sn-2 acil del fosfolípido, si la hidrólisis es sobre el grupo 1-acil, sería llamado fosfolipasa A_1 , en tanto si la hidrólisis es en la tercera posición, entonces tendríamos a las fosfolipasas C y D (Scott *et al.*, 1990; Kini, 2000).

2.4.2. Mecanismo de acción

El mecanismo catalítico de la fosfolipasa A_2 (PLA_2), sobre el sustrato fosfolípido, es hidrolizar el grupo sn-2 acil del 1,2-diacil-3-sn-fosfoglicerido. La histidina en la posición 48 (His48), inicia la actividad catalítica (Verheij *et al.*, 1980), ya que su inactivación por modificación química con el bromuro de p-bromofenacilo (BPB) confirma la pérdida total de hidrólisis sobre el fosfolípido (Verheij *et al.*, 1980). El ion calcio (Ca^{2+}) es esencial en la actividad, ya que está cerca al ácido aspártico en la posición 49 (Asp49) (Dijkstra *et al.*, 1981). La His48 forma un enlace con el ácido aspártico (Asp99), este a su vez ligado a las tirosinas (Tyr52 y Tyr73), proporcionando un soporte estructural y formando la red catalítica (Scott *et al.*, 1990), asimismo, la Asp49 y Gly30 interaccionan con el Ca^{2+} , este ligado al sustrato, formando una estabilidad e intermedio tetraédrico. El anillo imidazol de la His48, capta un protón de una molécula de agua (nucleófilo) y teniendo una distancia de 2.6 Å hacia el oxígeno de la posición sn-2 del fosfolípido, será protonado por His48, lo cual conduce a un colapso del intermedio tetraédrico (Scott *et al.*, 1990), y liberación de productos. De manera que se produce un estado de formación, estabilización y colapso del intermedio tetraédrico y liberación de productos (figura 3) (Scott *et al.*, 1990).

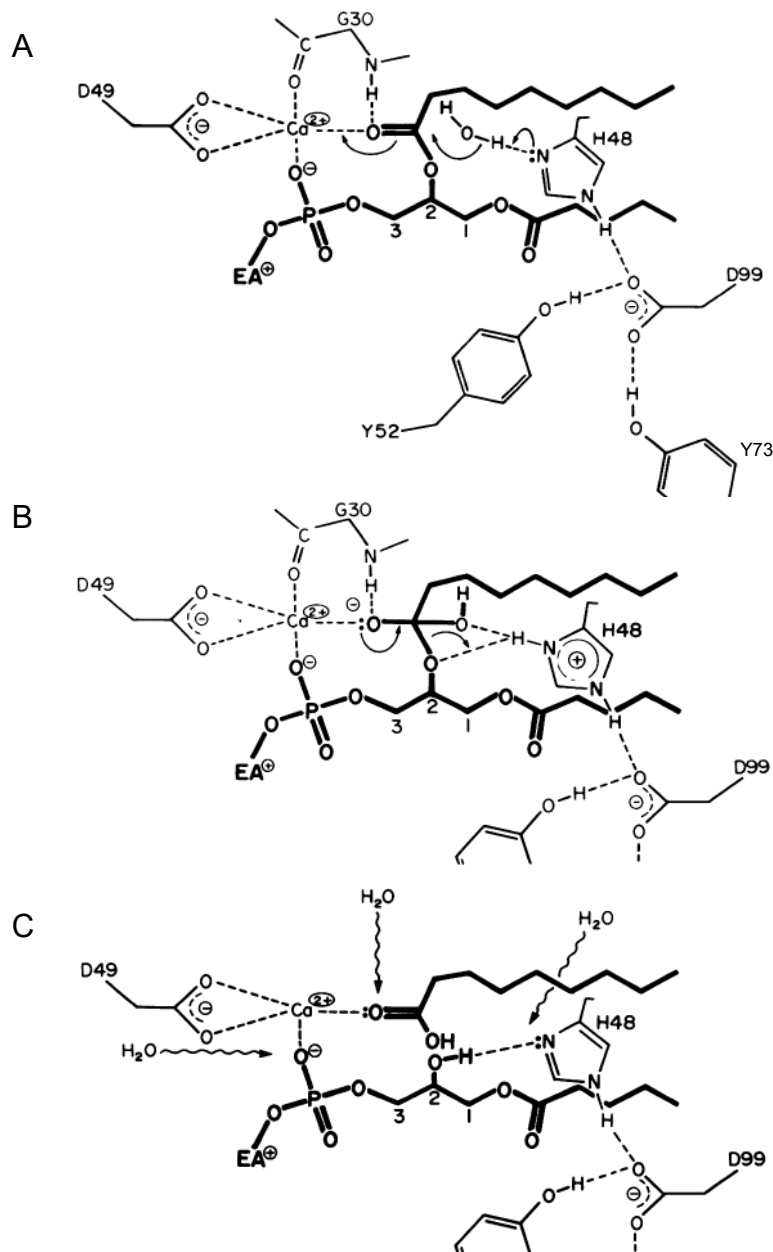


Figura 3. Mecanismo catalítico de la PLA₂. A) La H48 capta un proton (H⁺) de la molécula de agua y el *loop* de ion Ca⁺² estabiliza al fosfolípido, B) colapso del intermedio tetraédrico y en C) liberación de los productos; ácido graso y lisofosfolípido (Fuente: Scott *et al.*, 1990)

2.4.3. Características bioquímicas

Las sPLA₂ son enzimas altamente termoestables (4 – 100 °C) y de alta variación de pH (2.5-10), aunque en ciertos valores disminuye su actividad enzimática

(Teixeira *et al.*, 2011; Santos-Filho *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2013). Además, la actividad catalítica requiere, como cofactor al ion calcio (Ca^{+2}). También, presentan actividad enzimática sobre el sustrato heterogéneo lipoproteico, yema de huevo, siendo un método relativamente sencillo de realizar y de bajo costo para evaluar y confirmar la presencia de la enzima en determinadas fracciones de purificación (Vidal y stopanni, 1971), asimismo, dicho método fue empleado ampliamente en diferentes serpientes para determinar la actividad enzimática de fosfolipasa A₂ (Lazo *et al.*, 1998; Malaga *et al.*, 2000; Huatuco *et al.*, 2004; Mejia *et al.*, 2006; Inga *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2012; Barbosa *et al.*, 2013; Teixeira *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos investigadores prefieren emplear el sustrato de fosfatidilcolina para evaluar la actividad, siendo un método mucho más sensible y de mayor precisión (Araujo y Radvanyi, 1987), el cual fue empleado en la PLA₂ ácida (Fernandez *et al.*, 2010). Posteriormente, se mejoró ciertos parámetros en esta metodología (Oliveira y Palma, 1997) y fue usado para confirmar la actividad enzimática de PLA₂ en diferentes serpientes (Fanny *et al.*, 1998; Inga *et al.*, 2010). También se han reportado otros sustratos sintéticos para medir actividad enzimática, como el ácido 4-nitro-3-octaoiloxybenzoico (NOBA) (Cogo *et al.*, 2006; Posada *et al.*, 2017; Resende *et al.*, 2017) y fosfolípidos fluorescentes (Rodrigues *et al.*, 2007; Santos-Filho *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2011)

Las sPLA₂ de serpientes son de bajo peso molecular (13-15 kDa) (Six y Denni, 2000; Lomonte y Gutiérrez, 2011; Calvet *et al.*, 2007), calculado en algunos casos por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (Laemmli, 1970) y también por espectrometría de masas, la cual resulta ser más preciso en la identificación del peso molecular (Cogo *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011; Vargas *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2013; Correa *et al.*, 2016; Posada *et al.*, 2017). Así tenemos, algunos pesos moleculares de PLA₂ ácidas que están entre 13 - 15 kDa, las cuales fueron calculados por SDS-PAGE en diferentes serpientes del género *Bothrops* sp. (Andriao-Escarso *et al.*, 2002; Ketelhut *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2013; Silveira *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2017; Resende *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2011; Santos-Filho *et al.*, 2008)

Por otro lado, las PLA₂ presentan un amplio rango de isoformas, las cuales tienen efectos biológicos diferentes. Tales isoformas de PLA₂ pueden ser ácidas o

altamente básicas dependiendo de su punto isoeléctrico (pI) (Lomonte y Gutierrez, 2011). Las isoformas de PLA₂ ácidas en el veneno de diferentes serpientes presentan un pI por debajo del valor de 6, tales como: la fosfolipasa A₂ ácida aislada del veneno de *Bothrops asper* (Fernandez *et al.*, 2010), de *B. jararacussu* (Ketelhut *et al.*, 2003), de *Lachesis muta* (Jimenez *et al.*, 2010), de *Porthidium nasutum* (Vargas *et al.*, 2012), de *Agkistrodon piscivorus leucostoma* (Resende *et al.*, 2017), de *B. moojeni* (Santos-Filho *et al.*, 2008), de *B. asper* (Posada *et al.*, 2017), de *B. pauloensis* (Rodrigues *et al.*, 2007), de *B. insularis* (Cogo *et al.*, 2006) y en *B. moojeni* (Silveira *et al.*, 2013). Por otra parte, las isoformas de PLA₂ básicas presentan un punto isoeléctrico por encima del valor de 7 (Núñez *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2016).

2.4.4. Características moleculares

Las sPLA₂ del subgrupo (GIIA), presenta una división en dos clases, la Asp49 PLA₂ (D49PLA₂) (Cogo *et al.*, 2007; Resende *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2017; Santo-Filho *et al.*, 2008) y Lys49 PLA₂ (K49PLA₂) (Lomonte *et al.*, 1999; Nuñez *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2016). Las D49PLA₂ son enzimas altamente catalíticas, mientras que las K49PLA₂ no presenta o tiene muy baja actividad catalítica, por lo mismo, estas últimas son llamadas fosfolipasas A₂ homólogas. Sin embargo, ambas presentan efectos miotóxicos (Lomonte, 2012). Las D49PLA₂ presentan isoformas las cuales pueden ser fosfolipasas A₂ ácidas (D49) (Andriao-Escarso *et al.*, 2002; Silveira *et al.*, 2013; Fernandez *et al.*, 2010; Resende *et al.*, 2017) o básicas (D49) (Rodrigues *et al.*, 2004), en tanto que las K49PLA₂ homólogas, también presentan isoformas básicas K49 (Nuñez *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2016).

Por otra parte, el secuenciamiento del cDNA de muchas fosfolipasas A₂ ácidas tiene un peso ligeramente variado y permite deducir la estructura primaria de la proteína madura, así tenemos: la PLA₂ ácida del veneno de la serpiente *Bothrops pauloensis* tiene una longitud de 417 pares de bases (pb), cuya proteína madura es de 122 residuos de aminoácidos (Barbosa *et al.*, 2013), en *B. pirajai* una longitud de 366 pb y una proteína de 122 residuos de aminoácidos (Teixeira *et al.*, 2011), en *B. moojeni*, 414 pb que codifica una proteína de 122 residuos de aminoácidos (Silveira

et al., 2013), en *L. muta* 414 pb y de 122 residuos de aminoácidos la proteína madura (Jimenez *et al.*, 2010).

Así mismo, algunos prefieren secuenciar la región N-terminal por el método de degradación edman o combinado con espectrofometría de masas para identificar dichos residuos o completar la estructura primaria de la proteína (Rodrigues *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2007; Posada *et al.*, 2017; Fernandez *et al.*, 2010; Cogo *et al.*, 2006; Santo-Filho *et al.*, 2008; Correa *et al.*, 2016; Resende *et al.*, 2017). En el caso de las K49PLA₂ básicas, también presentan un cDNA de 414 pb y una proteína madura de 122 residuos de aminoácidos (Nuñez *et al.*, 2004). Además, estas enzimas cuentan con un péptido señal de una longitud de 16 residuos de aminoácidos, utilizado por el sistema celular para la secreción de la proteína (Nuñez *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2013; Jimenez *et al.*, 2010)

Por otro lado, la estructura primaria presentan residuos altamente conservados, en el centro catalítico están presente los residuos de aminoácidos His48, Asp99, Tyr52 y Tyr73 (Verheij *et al.*, 1980; Scott *et al.*, 1990; Murakami *et al.*, 2006; Cogo *et al.*, 2006), un loop de unión al ion calcio (Ca²⁺) (Tyr28, Gly30, Gly32 y Asp49) (Dijkstra *et al.*, 1981; Arni y Ward, 1996; Magro *et al.*, 2004), aunque en la PLA₂ ácida de la serpiente *B. jararacussu* está formado por Tyr28, Gly32, Gly33 y Asp49 (Murakami *et al.*, 2006), asimismo presentan 14 residuos de cisteínas, los cuales forman los 7 enlaces disulfuro característico en el GII (Cys27-Cys126, Cys29-Cys45, Cys44-Cys105, Cys51-Cys98, Cys61-Cys91, Cys84-Cys96 y Cys51-Cys133) (Arni y ward, 1996; Doley *et al.*, 2010; posada *et al.*, 20017; Barbosa *et al.*, 2013; Cogo *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2017; Calvete *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2011), no obstante en *B. jararacussu* lo presentan ligeramente diferente (Cys25-Cys115, Cys28-Cys44, Cys43-Cys95, Cys49-Cys122, Cys50-Cys88, Cys57-Cys81 y Cys75-Cys86) (Murakami *et al.*, 2006) y un lado C-terminal con una extensión de 5-7 residuos de aminoácidos (Arni y Ward, 1996; Kang *et al.*, 2011), y cabe resaltar que en esta extensión está presente el residuo de aminoácido Cys133, la cual es único en el GII (Figura 4).

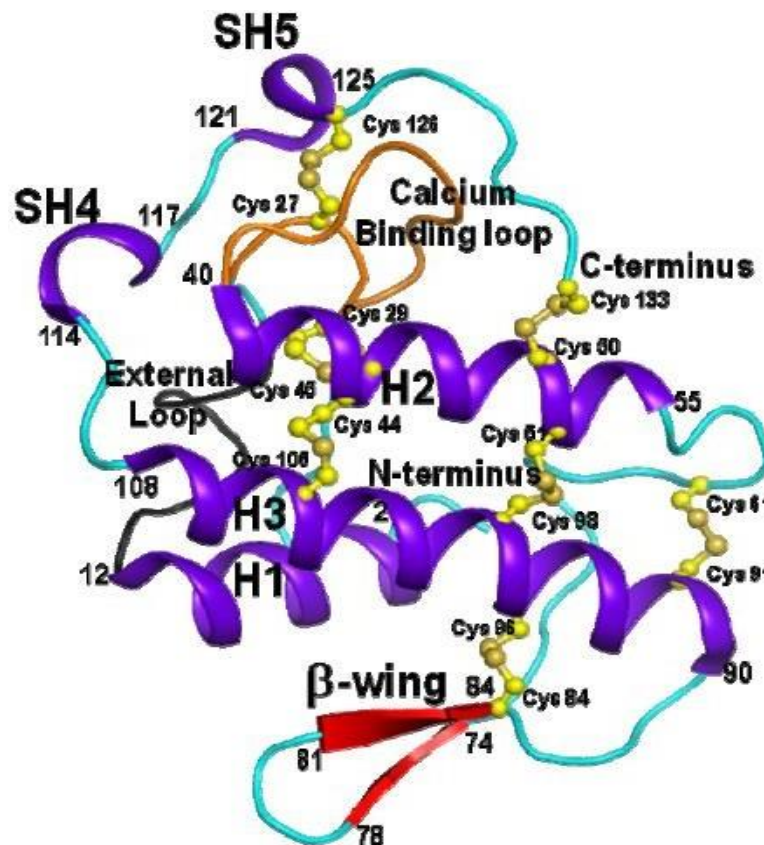


Figura 4. Estructura de una PLA₂ secretora del subgrupo IIA. Se observa las tres α -hélices (H1, H2, H3), α -hélice cortas (SH4 y SH5), en rojo la lamina- β antiparalelo (β -wing) y en amarillo los siete enlaces disulfuro (Cys-Cys) (Fuente: Kang *et al.*, 2011)

Por otra parte, se ha empleado en muchos trabajos la estructura primaria de aminoácidos para identificar el origen y evolución de las familias de toxinas en diferentes serpientes desarrollando el árbol filogenético (Fry y Wuster, 2004), así mismo, se puede iniciar apartir del cDNA el estudio de diversificación de toxinas (Fry *et al.*, 2008). En otros estudios para entender la relación evolutiva en el genero *Bothrops* sp. se empleó la secuencia de DNA mitocondrial para agruparlos (Carrasco *et al.*, 2012). Así, uno de los métodos para desarrollar el árbol filogenético es el método algorítmico Neighbor-Joining basado en la distancia evolutiva (Saitau y Nei, 1987), así dicho método fue empleado en la agrupación de las fosfolipasas A₂ ácidas (D49) y básicas (D49) (Cogo *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2013), mientras que en otras investigaciones fueron empleados el análisis filogenético bayesiano para crear el árbol evolutivo (Figura 5)(Teixeira *et al.*, 2011) y el método de máximo likelihood (Fernandez *et al.*, 2010)

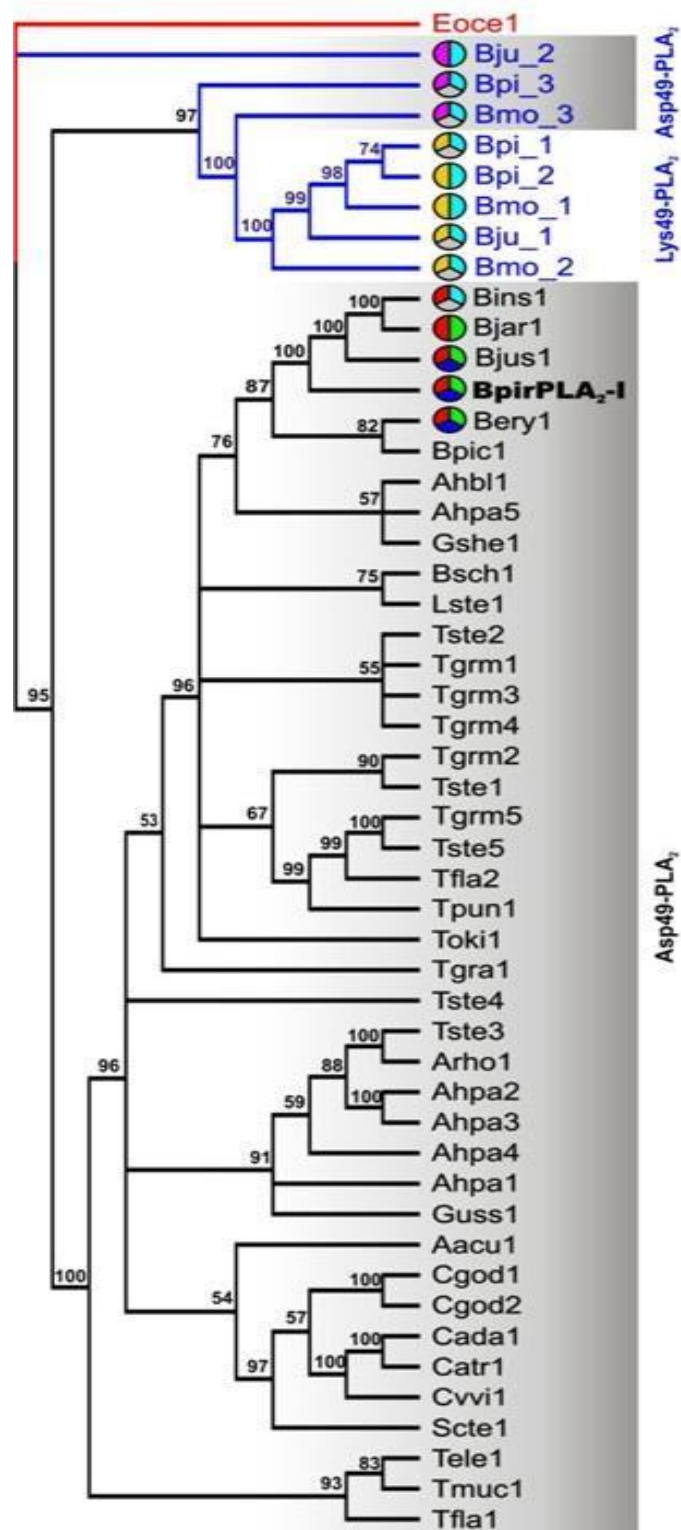


Figura 5. Árbol filogenético de fosfolipasa A₂ basado en diferentes estructuras (Asp49-Lys49), físico-químico (ácidos-básicos) y características funcionales (Fuente; Teixeira *et al.*, 2011)

2.4.5. Características estructurales

En la determinación de la estructura experimental de varias PLA₂ purificadas, estas han sido basados por métodos de cristalografía (difracción de rayos-X) (Verheij *et al.*, 1980; Dijkstra *et al.*, 1981; Scott *et al.*, 1990; Arni y Ward, 1996; Chandra *et al.*, 2000; Andriao-Escarso *et al.*, 2002; Ketelhut *et al.*, 2003; Magro *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2011). Sin embargo, algunos investigadores emplean programas bioinformáticos para predecir la estructura teórica de la proteína en estudio, basado por homología comparada con otras estructuras de fosfolipasas A₂ depositados en el *Protein Data Bank* (PDB), algo que permite entender hasta cierto punto la estructura de la proteína en estudio (Cogo *et al.*, 2006; Fernandez *et al.*, 2010; Posada *et al.*, 2017; Resende *et al.*, 2017; Teixeira *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2013). Por otra parte, también puede ser identificada la estructura primaria de aminoácidos de la proteína por espectrofometría de masas o secuenciando el cDNA, amplificado previamente por la técnica de PCR, para realizar el modelamiento teórico, sin embargo, no es comparable a una investigación por difracción de rayos-X para determinar la estructura.

La estructura terciaria de la PLA₂ del GII, cuenta con tres α -hélices principales; el α -hélice 1 que corresponde al extremo N-terminal con residuos de aminoácidos (1-12), la α -hélice 2 constituido entre los residuos (A40-G53) y la α -hélice 3 con residuos desde (P90-D108). Las α -hélice 2 y 3 son antiparalelas y forman la red catalítica de la enzima con los residuos (H48, D49, D99, Y52 y Y73) (Verheij *et al.*, 1980; Dijkstra *et al.*, 1981; Scott *et al.*, 1990; Kang *et al.*, 2011; Magro *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2013; Ketelhut *et al.*, 2003). Asimismo, presenta una α -hélice corta, dos hojas- β antiparalela, llamado (β -wing), que van entre los residuos (Y75-C84) y un loop C-terminal constituido entre 5-7 residuos de aminoácidos el cual es único en el GII ((Arni y Ward, 1996; Murakami *et al.*, 2006; Posada *et al.*, 2017). Asimismo, presentan un *loop* de unión al ion calcio comúnmente (Y28, G30, G32 y D49) (Arni y Ward, 1996; Kang *et al.*, 2011; Magro *et al.*, 2004), aunque en la *Bothrops jararacussu* los residuos de glicina están en la posición G32 y G33 (Murakami *et al.*, 2006) y un canal hidrofóbico por el cual ingresa el sustrato de fosfolípido hasta al centro catalítico (figura 6) (Arni y Ward, 1996; Kang *et al.*, 2011)

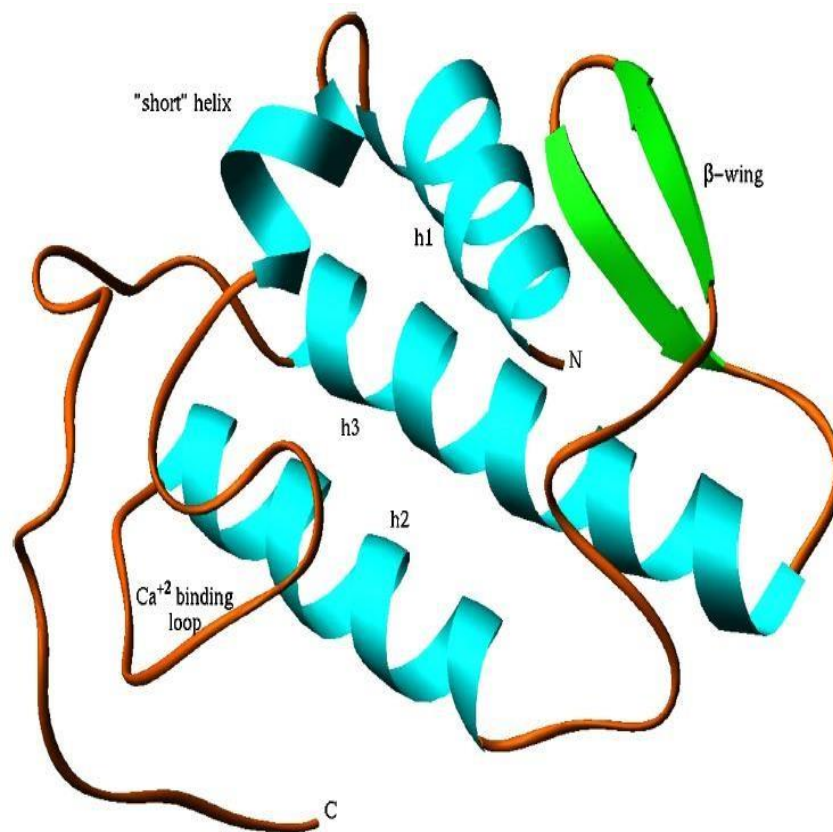


Figura 6. Estructura de una PLA₂ ácida hipotensiva e inhibidora de la agregación plaquetaria. Resuelto por cristalografía Rayos -X (PDB: 1UMV), donde se aprecia el loop de unión al ion Ca²⁺, las tres α -hélices, un corto α -hélice, el hoja- β (β -wing) antiparelela, la región N-termina y C-terminal (Fuente: Magro *et al.*, 2004)

Las fosfolipasa A₂ pueden interactuar entre ellas para formar agregados, así como la PLA₂ ácida hipotensiva e inhibidora de la agregación plaquetaria puede estar en un estado monómero m-BthA-I (Figura 6) o dimérico d-BthA-I (Magro *et al.*, 2004). Asimismo, otras PLA₂ forman agregados diméricos en *B. asper* y *C. atrox*, e incluso triméricos en *N. naja naja*, los cuales en solución acuosa son estables (Arni y Ward, 1996), la PLA₂ ácida de *B. neuwiedi* forma una estado dimérico (Correa *et al.*, 2016), de modo que estos complejos forman estados de agregación estable; homodímeros, heterodímeros, heterotrímeros o heteropentámeros (Kini, 2003; Doley *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2011), los mismos que

contribuyen significativamente con su efecto biológico, aunque la mayoría de fosfolipasas A₂ ácidas existen como monómeros (Fernandez *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2017; Rodrigues *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2012)

Por otro lado, Kini y Iwanaga, (1986), describieron que la región de la superficie de la estructura de una PLA₂ comprende una característica catiónica debido a los residuos de aminoácidos 79- 87, la cual muestra un patrón similar con las PLA₂ miotóxicas y neurotóxicas, característica que carecen las PLA₂ no neurotóxicas. Asimismo, alrededor de los residuos 54-77, cargados positivamente, le confiere el efecto anticoagulante, mientras que ciertas modificaciones de dichos aminoácidos conducen a la pérdida de la actividad anticoagulante (Kini y Evans, 1987; Kini, 2005). Adicionalmente, el reconocimiento de la interfase agua-lípido por parte de la proteína permite abrir la α -hélice 1 (N-terminal) entre los residuos (1-12) para formar el canal hidrofóbico que se encuentra a una distancia de 14 Å del centro catalítico, lo cual permite captar un fosfolípido y conducirlo a través del canal hacia el sitio activo para su hidrólisis (Scott *et al.*, 1990; Berg *et al.*, 2001; Teixeira *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha sintetizado el péptido que comprende los residuos de aminoácidos (115-129) cerca de la región C-terminal de BpirPLA₂-I, la cual juega un rol importante en la actividad antiplaquetaria (Teixeira *et al.*, 2011), citolítica, bactericida y miotóxica en K49PLA₂ (Miotoxina II) (Lomonte *et al.*, 1999)

2.4.6. Efectos biológicos

Los efectos biológicos de las fosfolipasas A₂ ácidas o básicas, son diversos, pudiendo ser; neurotóxicas, miotóxicas, necróticas, cardiotoxinas, anticoagulantes, inhibición de la agregación plaquetaria, hemolítica, hemorrágica, hipotensiva, edemática, bactericida y daño de órganos (Kini, 2003; 2005). La isoforma básica es más miotóxica que la isoforma ácida y cuando actúan juntas potencian el efecto biológico (Mora-Obando *et al.*, 2014; Lomonte y Gutiérrez, 2011). Sin embargo, se han reportado diversos efectos biológicos en las isoformas ácidas, las cuales pueden ser miotóxica y edemática (Cogo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Posada *et al.*, 2017), miotóxica, edemática e inhibidora de la agregación plaquetario (Santos-Filho *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2013), hipotensiva e inhibidora de la

agregación plaquetaria (Teixeira *et al.*, 2011), anticoagulante y citotóxica (Fernandez *et al.*, 2010).

Así mismo, también en *B. jararacussu* la D49PLA₂ ácida presenta baja miotoxicidad, pero es anticoagulante (Ketelhut *et al.*, 2003), en *Porthidium nasutum* PLA₂ ácida es antibacteriano (Vargas *et al.*, 2012) y en *Daboia russelli pulchella* la PLA₂ es neurotóxica pre sináptica (Chandra *et al.*, 2000), en cambio otras PLA₂ ácida no es miotóxica, pero si aumenta la toxicidad neuromuscular (Resende *et al.*, 2017), mientras que dos D49PLA₂ básicas son neurotóxicas y bactericidas (Rodrigues *et al.*, 2004). Por lo que, las PLA₂ ácida no cumplen solamente la función digestiva, como se pensaba antes, por el contrario, presentan múltiples efectos biológicos durante el envenenamiento (Mora-Obando *et al.*, 2014), mientras que las K49PLA₂ homologas desarrollan su efecto miotóxico debido a su región C-terminal (Nuñez *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2016, Lomonte y Gutiérrez, 2011; Lomonte, 2012).

Por lo mismo, la investigación sobre las propiedades biológicas, bioquímicas y estructurales que presenta la PLA₂ ácida son importantes, especialmente el género *Bothrops*, ya que son los principales causantes de una alta tasa de casos por ofidismo en la selva alta y baja del Perú, de manera que su investigación es importante para comprender más a profundidad y apoyado por el campo de la biofísica serán relevantes al momento de desarrollar un antiveneno para neutralizar específicamente a la isoforma ácida. Se describe algunas características de la isoforma ácida y básica (tabla 2).

Tabla 2. Características biológicas y bioquímicas de las isoformas de PLA₂ ácidas y algunas básicas.

Nombre	Efecto biológico	Actividad enzimática	Nombre de la especie	Clase	pl	Referencia
BinTX-I	Edema, CK	Alta	<i>B. insularis</i>	Asp49	5.05	Cogo, <i>et al.</i> , 2006
BinTx-II	Edema, CK	Alta	<i>B. insularis</i>	Asp49	4.49	Cogo <i>et al.</i> , 2006
Bp-PLA₂	Edema, CK	Alta	<i>B. pauloensis</i>	Asp49	4.3	Rodrigues <i>et al.</i> , 2007
BmooTX-I	Edema, CK	Alta	<i>B. moojeni</i>	Asp49	4.2	Santo-Filho <i>et al.</i> , 2008
BpirPLA₂-I	Hipotensiva, inhibe la agregación plaquetaria	Alta	<i>B. pirajai</i>	Asp49	4.8	Teixeira <i>et al.</i> , 2011
BpPLA₂-TXI	Edema, CK	Alta	<i>B. pauloensis</i>	Asp49	4.98	Barbosa <i>et al.</i> , 2013
BaCol-PLA₂	Hemólisis, Edema, CK	Alta	<i>B. asper</i>	Asp49	4.4	Posada <i>et al.</i> , 2017
BaspPLA₂-II	No miotóxica	Alta	<i>B. asper</i>	Asp49	4.9	Fernandez <i>et al.</i> , 2010
ApITx-I	No miotóxica, si neurotóxica	Alta	<i>A.p. leucostoma</i>	Asp49	5.12	Resende <i>et al.</i> , 2017
PnPLA₂	Antibacterial	Alta	<i>P. nasutum</i>	Asp49	4.6	Vargas <i>et al.</i> , 2012
BnuTX-I	Edema, miotóxica, citotóxica , antibacterial	Nula	<i>B. neuwiedi</i>	Lys49	9.5	Correa <i>et al.</i> , 2016
BmooPLA₂	Antibacterial, inhibe agregación plaquetaria No miotóxica	Alta	<i>B. moojeni</i>	Asp49	5.2	Silveira <i>et al.</i> , 2013
BthA-I-PLA₂	Anticoagulante No miotóxica	Alta	<i>B. Jararacussu</i>	Asp49	4.5	Murakami <i>et al.</i> , 2006
BthA-I	Hipotensiva Inhibidor de agregación plaquetaria	Alta	<i>B. Jararacussu</i>	Asp49	5.0	Magro <i>et al.</i> , 2004
BthA-I-PLA₂	Hipotensiva Inhibe la agregación plaquetaria No miotóxica	Alta	<i>B. Jararacussu</i>	Asp49	4.5	Adriao-Escarso <i>et al.</i> , 2002
SIISPIIB	Anticoagulante moderado Inhibe agregación plaquetaria	intermedio	<i>B. Jararacussu</i>	Asp49	5.3	Ketelhut <i>et al.</i> , 2003
Myotoxin I	Miotóxica No anticoagulante	Nula	<i>B. atrox</i>	Lys49	8.9	Núñez <i>et al.</i> , 2004
BnpTX-I	Neurotóxica Bactericida Anticoagulante Miotóxica Edemática	Alta	<i>B. neuwiedi</i>	Asp49	7.8	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
BnpTX-II	Neurotóxica Bactericida Anticoagulante Miotóxicas Edemática	Moderado alto	<i>B. neuwiedi</i>	Asp49	7.8	Rodrigues <i>et al.</i> , 2004
Miotoxina II	Miotóxica	Nula	<i>B. asper</i>	Lys49	< 7.0	Lomonte <i>et al.</i> , 1999
BaPer-PLA₂a	No miotóxica	Alta	<i>B. atrox</i>	Asp49	4.4	Quispe <i>et al.</i> , 2019

2.5. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Hay diversas metodologías en la purificación de proteínas en venenos de serpientes y la calidad es importante para un estudio de caracterización estructural y funcional, de modo que algún contaminante puede conducir a resultados inválidos. En un primer paso de purificación se recomienda iniciar con una cromatografía en gel de filtración, seguido de una cromatografía de intercambio iónico. En el gel de filtración se emplea la resina Sephadex (G-50 o G-75) o Superdex G-75, para la separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular, mientras que en el segundo paso sería en una columna de intercambio iónico, para separar a las proteínas de acuerdo a su diferencia de cargas, acompañado de una gradiente de sal. En algunos casos se emplean un tercer paso usando un sistema de cromatografía líquida de alta presión en fase reversa, por sus siglas en inglés (RP- HPLC) para separar contaminantes basado en su diferencia de hidrofobicidad (Kini, 2000; Doley *et al.*, 2010). Las fosfolipasas A₂ presentan muchas isoformas, pueden auto agregarse e interactuar con otras proteínas del veneno (Kini, 2000). Además, demuestran homogeneidad en su peso molecular, punto isoeléctrico e incluso en su secuencia de aminoácidos del lado N-terminal (Doley *et al.*, 2010), por ello son empleados métodos más sofisticados para su aislamiento como la electroforesis en capilaridad y espectrofotometría en masas para determinar su homogeneidad y su secuencia de aminoácidos (Kini, 2003).

Por otro lado, en la purificación de una miotoxina de *B. brazili* se uso una resina CM-Sephadex C-50 de intercambio iónico (Pantigoso *et al.*, 2001), en la PLA₂ de *B. atrox* en la resina CM-Sephadex C-50 (Huatuco *et al.*, 2004), en PLA₂ se empleó la resina CM-Sephadex C-50 seguido de un Sephadex G-50 (Inga *et al.*, 2010), mientras que en otras investigaciones para aislar a la PLA₂ ácida en diferentes serpientes han usando en uno de sus pasos a RP-HPLC (Teixeira *et al.*, 2011; Santos-Filho *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2007; Cogo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2013). Además, en un estudio proteómico o venómico para la purificación del veneno total fue usando un RP-HPLC (Calvete *et al.*, 2007; Kohlhoff *et al.*, 2012), en otros estudios también fue usado RP-HPLC (Adriao-Escarso *et al.*, 2002; Ketelhut *et al.*, 2003; Correa *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2004). Este sistema de RP-HPLC, es el más empleado al final del aislamiento de

proteínas de veneno. Sin embargo, el sistema cromatográfico líquido de presión media (MPLC), también ha sido utilizado (Baruah *et al.*, 2018; Becker *et al.*, 2019), para obtener una proteína purificada para estudios de difracción de rayos-X y determinar con rigor su estructura y ciertos residuos de aminoácidos que forman parte del centro catalítico o ser blancos de drogas para su inhibición.

2.6. MIOTOXICIDAD

2.6.1. Definición

Es el efecto biológico generado por toxinas de bajo peso molecular con o sin actividad enzimática, actuando sobre las membranas celulares, denominadas comúnmente como miotoxinas. Las fosfolipasas A₂ básicas son las principales toxinas con alta miotoxicidad, aunque las isoformas ácidas, también, presentan actividad miotóxica (Gutiérrez y Ownby, 2003; Lomonte y Gutiérrez, 2011).

2.6.2. Envenenamiento

Es el evento por el cual la serpiente muerde a su depredador o presa inyectando su veneno, inoculando una serie de toxinas, con el objetivo de defenderse o capturar a su presa. Lo cual, conduce a una serie de efectos biológicos tal como la miotoxicidad.

2.6.3. Alteración de la estructura en las células musculares.

Las D49PLA₂, actúan a nivel de membrana de las células musculares ocasionando una disrupción de la membrana (Lomonte *et al.*, 1999; Gutiérrez y Ownby, 2003; Lomonte y Gutiérrez, 2011). Hay patrones en la degeneración celular del músculo esquelético, el cual se enumera del siguiente modo: 1) disrupción de la membrana plasmática, 2) formación de 'lesión delta', y degeneración local en las fibras musculares, 3) hiper contracción de miofilamentos, 4) ruptura de la membrana mitocondrial, 5) disrupción de la membrana intracelular (retículos sarcoplasmicos y túbulos T) y 6) pycnosis del núcleo (Gutiérrez y Ownby, 2003). El daño a la membrana celular ocasionan una rápida despolarización de la membrana y

liberación de marcadores tales como: mioglobina, creatina quinasa, lactato deshidrogenasa e influjo de ion Ca^{2+} (Gutiérrez *et al.*, 2009; Lomonte y Gutiérrez, 2011). Las D49PLA₂ y K49PLA₂ homóloga básicas son las más miotóxicas en *B. asper*, y es evidente que están implicadas directa o indirectamente en la desorganización de la membrana celular (Gutiérrez *et al.*, 2009). Por otra parte, los residuos catiónicos e hidrofóbicos (115-129) de la región C-terminal de la K49PLA₂ homóloga actúan directamente en la desorganización de la membrana causando el efecto miotóxico, citolítico y bactericida (Lomonte *et al.*, 1999; Lomonte, 2012)

La miotoxina de *Bothrops brazilli* es de naturaleza básica, no presenta actividad de PLA₂, y produce la liberación de creatina kinasa y lactato deshidrogenasa, hipercontracción, lesiones delta, incremento de iones de Ca^{2+} , lo cual conduciría a la liberación de proteasas y lipasas endógenas dependientes del calcio causando necrosis muscular (Pantigoso *et al.*, 2001; 2002). En tanto que otra miotoxina de *B. atrox* también es de naturaleza básica, dímero y con actividad enzimática (Huatuco *et al.*, 2004) La rápida hipercontracción depende del incremento de Ca^{2+} citosólico, debido al daño de la membrana plasmática, causa la activación del mecanismo contráctil celular (Gutierrez y Ownby, 2003). Asimismo, las miotoxinas en *B. asper* son altamente básicas, lo cual indica que interactúan con las cargas negativas de los fosfolípidos de membrana muscular (Lomonte y Gutierrez, 2011). Se muestra el esquema de la mionecrosis en la cual participa las PLA₂ (figura 7)

Por otro lado, la investigación de Bustillo *et al.* (2019), mostraron que las variantes de fosfolipasas A₂ Asp49 y Lys49 tiene diferencias en su efecto biológico tales como: miotoxicidad, citotoxicidad, actividad anti adhesión y la inhibición en la migración celular, los cuales fueron valores más alto para la Lys49PLA₂. Sin embargo, cuando se combinaron ambas isoformas se obtuvo un efecto sinérgico sobre la citotoxicidad en las células miogénicas C₂C₁₂. Otro caso interesante es cuando se combinaron toxinas de diferentes especies, como las PLA₂ de venenos de serpientes y la toxina melitina del veneno de la abeja. Los resultados mostraron un incremento de citotoxicidad debido a un fuerte efecto sinérgico sobre las células queratinocitos humanas inmortalizadas (Pucca *et al.*, 2020).

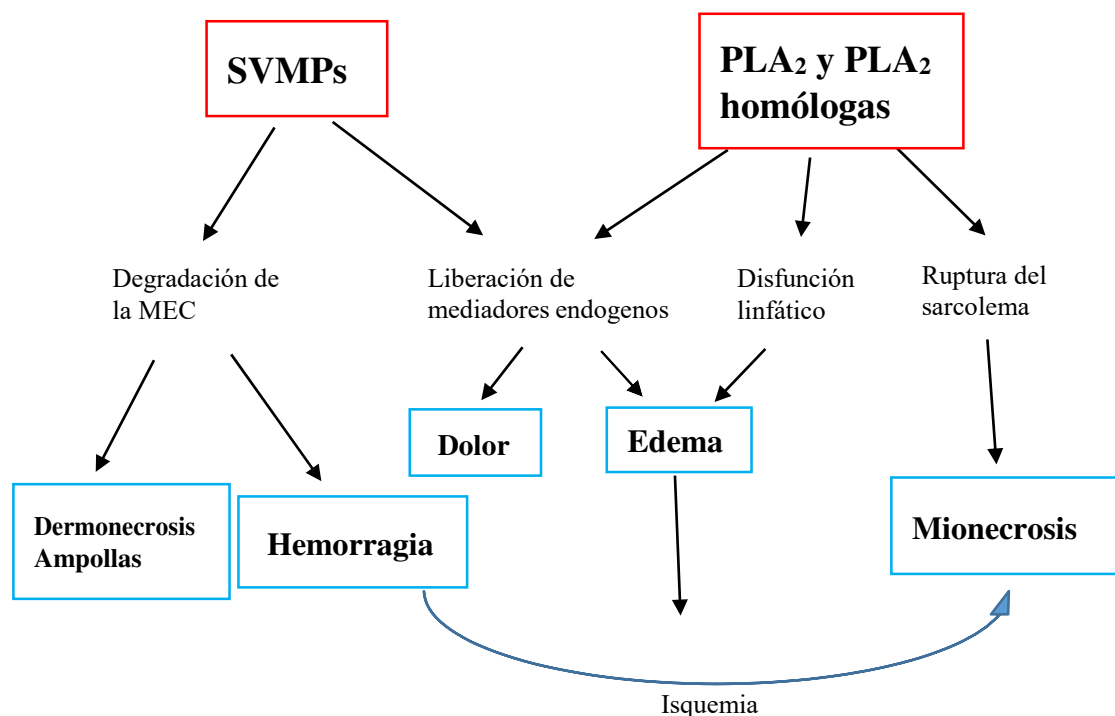


Figura 7. Esquema del daño al tejido local muscular causado por el veneno de *B. asper*. La mionecrosis es causado principalmente por las SVMPs, PLA₂ y PLA₂ homólogas. (Adaptado de Gutiérrez *et al.*, 2009)

2.7. HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Las herramientas bioinformáticas empleadas en la predicción, el análisis de la estructura primaria y terciaria de una proteína se basan en varios programas bioinformáticos y plataformas de uso abierto, en el cual se almacenan las secuencias completas de genes o proteínas. Las plataformas de base de datos disponibles son el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y UniProt (<https://www.uniprot.org/>) las cuales permiten descargar y analizar la secuencia del gen o proteína para el diseño de cebadores para su uso en la PCR.

Por otra parte, el programa ClustalW es empleado con frecuencia para los alineamientos múltiples de secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Asimismo, para la comparación por homología de la estructura de una proteína, se emplea el Banco de datos de proteínas (www.rcsb.org). Además, para la traducción de secuencias de nucleótidos a aminoácidos (<https://web.expasy.org/translate/>) y para

determinar valores teóricos de la proteína se usa el programa Protparam (<https://web.expasy.org/protparam/>) .

Por otro lado, en el desarrollo de la estructura por modelamiento comparativo se puede emplear los programas Robetta (new.robetta.org) y Modeller (<https://salilab.org/modeller>) . Así como, los programas SWISS-MODEL o PyMol.

2.8. CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

2.8.1. Sistemas de expresión en *E. coli* y *P. pastoris*

El sistema bacteriano *Escherichia coli* (*E. coli*), fue uno de los primeros microorganismos en ser investigados a nivel genético, ingeniería genética y biología molecular. Fue el organismo modelo en investigación básica e industrial y es el procariota más usado en la expresión de proteínas recombinantes por la industria farmacéutica (White *et al.*, 1994; Altenbuchner y Mattes, 2005). Sin embargo, el sistema bacteriano presenta algunos inconvenientes, lo cual consume tiempo y costo, inestabilidad del vector (fermentación en gran escala), ineficiencia en la traducción inicial y elongación, inestabilidad del mRNA, toxicidad de los productos génicos, inapropiado plegamiento y consecuentemente inactividad del producto proteico (Cole, 1996; Altenbuchner y Mattes, 2005; Rothan *et al.*, 2012). Asimismo, no puede expresar proteínas con alto contenido de enlace disulfuro, porque su citoplasma es un ambiente reductor (White *et al.*, 1994). No obstante, al arsenal de expresión en *E. coli* se ha agregado a las proteínas chaperoninas (GroEL), la cual ha mejorado *in vitro* e *in vivo* la expresión de proteínas recombinante solubles. Por lo cual, la sobre producción de proteínas foráneas en *E. coli*, continua en un paso importante (Cole, 1996). Hay cepas de *E. coli* que han sido mejoradas para el clonamiento y expresión de proteínas recombinantes en un estado soluble tales como: DH5 α , JM109 y BL21 (Altenbuchner y Mattes, 2005).

Por otro lado, *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) es usado como sistema eucariota de expresión y presenta muchas ventajas con respecto a *E. coli*, es fácil de manipular, produce alta densidad celular y utiliza como fuente de carbono al metanol (Cregg

et al., 2000). En un estudio comparativo entre ambos sistemas se concluyó que se obtiene más cantidad de proteína recombinante y funcional en *P. pastoris* que en *E. coli*. Sin embargo, en ambos casos se obtuvo la proteína recombinante en un estado soluble (Rothan *et al.*, 2012). Adicionalmente, en *P. pastoris*, se han producido proteínas recombinantes entre los que se pueden mencionar a; insulina humana, β -lactamasa, citoquina recombinante, factor de crecimiento y angiostatina. Las cuales son un sustento para usar a *P. pastoris* como sistema de expresión (Cregg *et al.*, 2000; Cereghino y Cregg, 2000; Zahrl *et al.*, 2017).

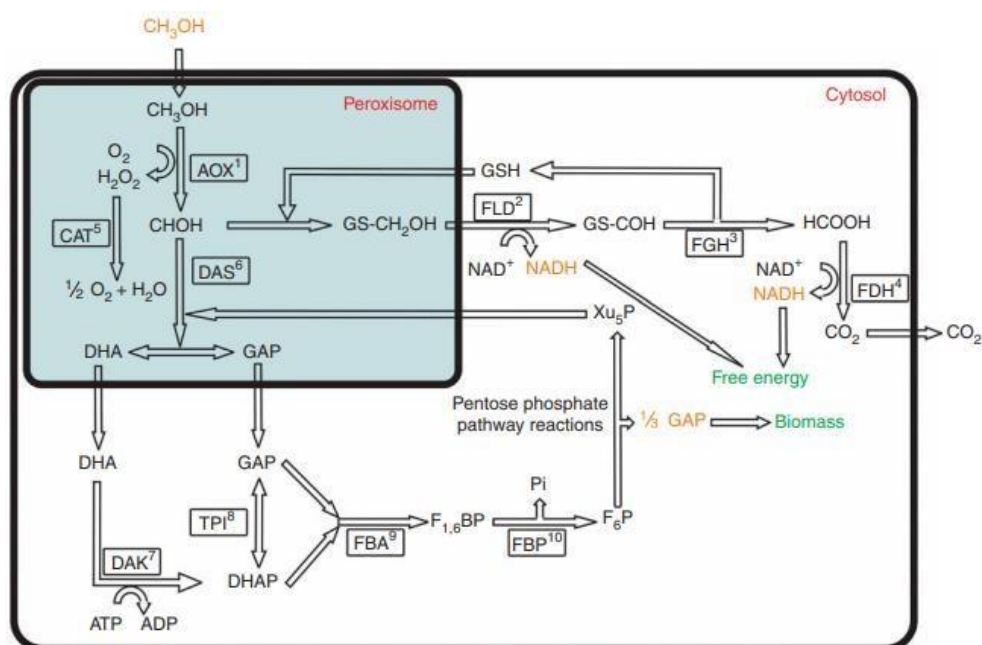
2.8.2. Sistema de expresión en *P. pastoris*

La técnica de DNA recombinante o clonamiento molecular, ha permitido grandes avances en la producción de proteínas recombinantes empleando inicialmente a *E. coli*, cepa K-12. Las enzimas de restricción tipo II fueron fundamentales para realizar los cortes adhesivos en secuencias específicas de cDNA y poder insertarlos en plásmidos, clonarlos y expresarlo (Bollon *et al.*, 2018; Ausubel *et al.*, 2003). Sin embargo, poco después sería desplazado por las levaduras.

La levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, es un sistema de expresión fácil de manipular, cultivar y un modelo biológico para la investigación en biología celular (Cregg *et al.*, 2000; Higgins y Cregg, 1998), asimismo permite entender la fisiología celular y su plasticidad a la adaptación en la producción de proteínas foráneas y ser empleado como factoría celular (Zahrl *et al.*, 2017). De acuerdo a la Web, www.Pichia.com, en *P. pastoris* se han producido 5000 proteínas recombinantes de diferentes organismos, tales como; bacterias, plantas, hongos, vertebrados, humanos y virus, el cual es debido a varios factores: 1) simplicidad de la técnica y su similaridad a *S. cerevisiae*, 2) la habilidad de expresar proteínas foráneas en altas cantidades a nivel intracelular y extracelular, 3) la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales (glucosilación, formación de enlaces disulfuro, plegamiento y procesamiento proteolítico (secuencia señal) y 4) La disponibilidad de diversos sistemas de expresión de proteínas (Cregg *et al.*, 1985; Cregg *et al.*, 2000; Cereghino y Cregg, 2000; Jan-Philipp *et al.*, 2017).

El éxito de *P. pastoris* es que no fermenta azúcares, no produce productos fermentativos tóxicos como el etanol. Toda la fuente de carbono es empleada en el

La primera enzima que participa en el metabolismo del metanol es el alcohol oxidasa (AOX), expresado por dos genes, AOX1 y AOX2, pero el gen AOX1 es la responsable de la vasta actividad de la AOX en la célula. AOX tiene poca afinidad por el O₂ por lo cual permite sintetizar grandes cantidades de la enzima (Cregg *et al.*, 1989). Así mismo, la enzima AOX oxida el metanol a formaldehído generando peróxido de hidrogeno y para evitar la toxicidad es catalizado dentro de la organela peroxisoma, luego de varios pasos el metanol es transformado hasta gliceraldehido-3-fosfato, la cual participa en la formación de alta densidad celular (Figura 8) (Cregg *et al.*, 1989; Cereghino y Cregg, 2000; De Schutter *et al.*, 2009).



29

quinasa; TPI8, triosafosfato isomerasa; FBA9, fructosa-1,6-bifosfato aldolasa; FBP10, fructosa -1,6-bifosfatasa; DHA, dihidroxiacetona; GAP, gliceraldehido-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; F1,6BP, fructosa-1,6-bifosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; Pi, fosfato; Xu5P, xilulosa-5-fosfato; GSH, glutatona. (Fuente: De Schutter *et al.*, 2009)

2.8.3. Cepas y fenotipos

Todas las cepas de *P. pastoris* fueron derivadas de la cepa silvestre Y-11430 desarrollado por (NRRL, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL). Así tenemos, la cepa silvestre X-33, el cual crece a gran escala utilizando metanol y presenta un fenotipo Mut⁺ (InvitrogenTM). La cepa auxotrófica GS115, presenta una mutación en el gen deshidrogenasa histidinol (*HIS4*), la cual evita la síntesis de histidina, crece en medio complejos y en un medio mínimo suplementado con histidina y presenta un fenotipo Mut⁺ y His⁻. (Cregg *et al.*, 1985). Mientras que la cepa KM71 tiene una delección larga en el gen *AOX1* y reemplazado por el gen *ARG4* de *S. cerevisiae*, y crece lentamente en un medio con metanol y presenta un fenotipo Mut^S y Arg⁺ (Tschopp *et al.*, 1987). El fenotipo (Mut^S), necesita poca cantidad de metanol para crecer y en algunos casos expresa más cantidad de proteína recombinante que la cepa silvestre (Higgins y Cregg, 1998; Cereghino y Cregg, 2000). Además, el genoma de *P. pastoris* de la cepa GS115 fue secuenciado encontrando 9.43 Mpb y un total de 5.313 genes codificantes de proteínas (De Schutter *et al.*, 2009).

2.8.4. Vector de expresión

Uno de los primeros vectores de clonamiento dentro de la ingeniería genética fueron los plásmidos pSC101 y ColE1, los cuales cuentan con sitios de restricción únicos, replicación autónoma y marcadores selectos, algo que fue considerado posteriormente en la construcción de vectores (Balbas *et al.*, 1988), así cuando se construyó el vector pBR322, se empezó de pMB1, pSC101 y pRSF2124, con la inserción de transposones, digestión con diferentes enzimas de restricción para adicionar genes de resistencia a antibióticos, origen de replicación y sitio de restricción múltiple (Balbas *et al.*, 1988; Ausubel *et al.*, 2003)

Por otra parte, el vector de expresión pPicZαA fue diseñado para *E. coli* y *P. pastoris*, el cual contiene un origen de replicación para el mantenimiento y replicación del plásmido en *E. coli* y marcadores para ambos microorganismos. El vector presenta un promotor fuerte inducible (P_{AOX1}), aunque es reprimido cuando la levadura crece en un medio con glucosa, glicerol o etanol y rápidamente inducido solo cuando se agrega metanol al medio. Sin embargo, el metanol es inflamable y sustancia peligrosa para fermentaciones a gran escala (Cereghino y Cregg, 2000; Ahmad *et al.*, 2014). El casete de expresión se inserta en el sitio de clonamiento múltiple (MCS), sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción por ejemplo *EcoRI*, *Sall* y *NotI*. Así mismo, el vector cuenta con un gen *Sh ble* pequeño (375 pb) de *Streptoalloteichus hindustanus*, la cual codifica una proteína de 13,665 Da, la cual le confiere resistencia a la droga Zeocina (Zeo^r). La Zeocina es una bleomicina que rompe la doble hebra de DNA cromosómico (Higgins *et al.*, 1998), mientras que el factor-α es el péptido de señalización, empleado durante la secreción de la proteína recombinante (Figura 9) (Higgins *et al.*, 1998; Cereghino y Cregg, 2000; InvitrogenTM 2010)

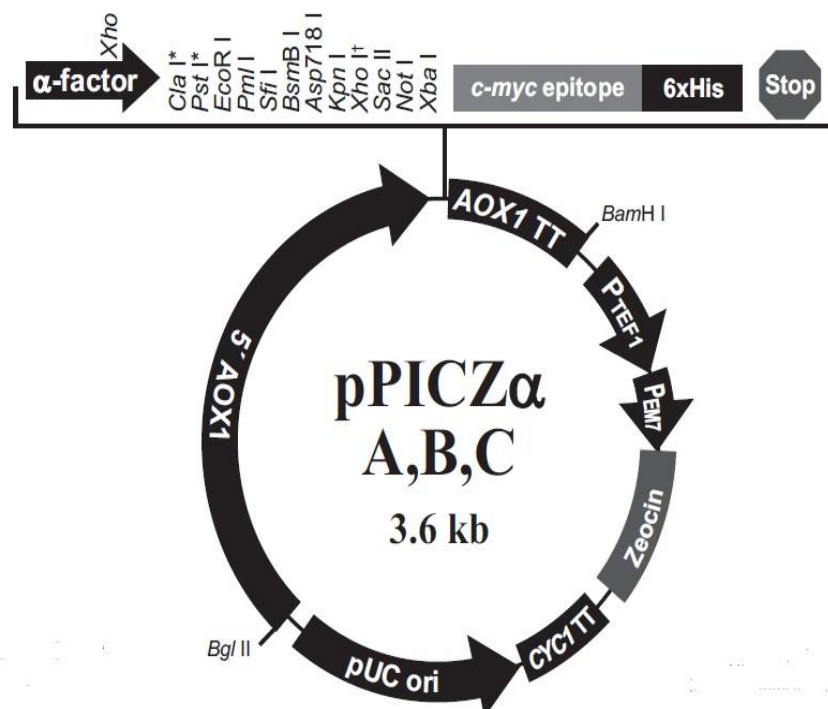


Figura 9. Mapa del vector de expresión pPicZαA, B, C (fuente: InvitrogenTM) y el vector presenta el gen de resistencia a zeocinaTM y un promotor del gen AOX1. El epítopo c-myc

resulta útil para la identificación de la proteína por anticuerpos específicos y la cola histidina para la purificación con resinas que contengan níquel.

2.8.5. Integración del vector al genoma de *P. pastoris*

La integración del vector de expresión en el genoma de *P. pastoris*, ocurre vía un evento de recombinación homologa que resulta de una integración tipo *crossover* entre la secuencia del vector y el genoma del huésped. Tal integración muestra una fuerte estabilidad y una alta frecuencia (50-80 %) de transformante en His⁺. El evento ocurre entre el sitio único del fragmento del promotor del gen AOX1, que pueden ser fragmentado y usados para integrarse al genoma de *P. pastoris* (Figura 10) (Cregg *et al.*, 2000; Cereghino y Cregg, 2000; Higgins y Cregg, 1998)

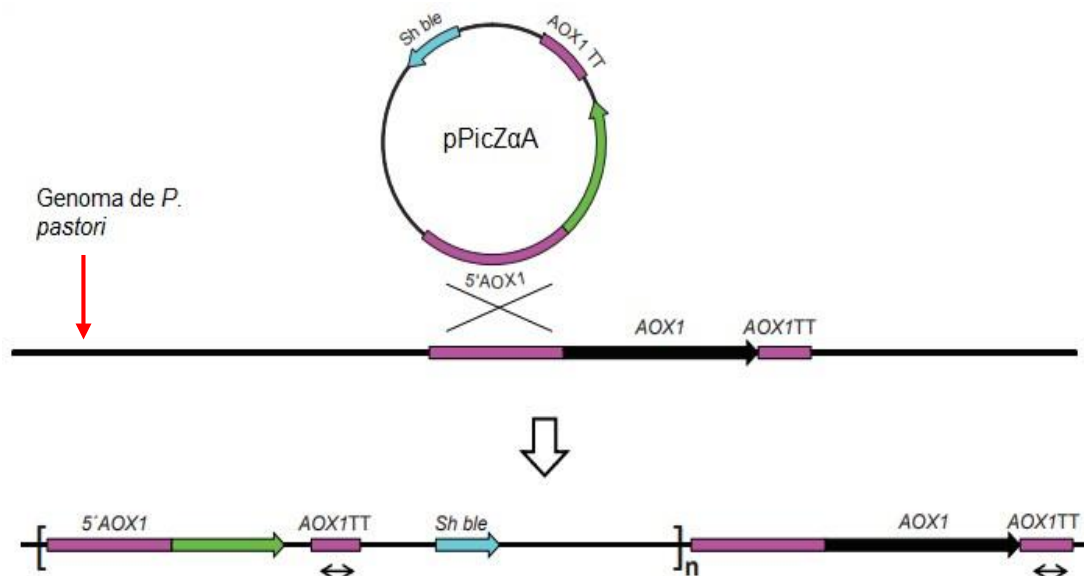


Figura 10. Integración del vector de expresión pPicZαA al genoma de *P. pastoris*. En color verde indica el gen de interés insertado en el vector, en color celeste indica el gen de resistencia contra la zeocina y la flecha de doble dirección muestra el lugar donde se ancla el primer AOX1 para la amplificación por PCR. (Fuente: adaptado de Nordén *et al.*, 2011)

2.9. CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE TOXINAS

Se han clonado y expresado en *Pichia pastoris* a muchas toxinas de venenos de serpientes, entre las que se puede mencionar a la desintegrina (rodostomina), toxinas tres dedos (dendroaspina, bungarotixinas), proteasas (batroxobina, gussurobina), sarafotoxina, fosfolipasas A₂ (IA), lectina tipo-C (AFCl), expresados en el vector pPIC9 o pPicZ en las cepas X-33 o GS115. Asimismo, el rendimiento obtenido en algunos casos fue muy bajo, de 0.1 mg/L con la bungarotoxina, mientras que en otros casos fue alto, de 150 mg/L en la proteína activador C (Anangi *et al.*, 2007). La secreción de proteínas heterólogas comprende varios niveles, los cuales están siendo optimizados por ingeniería de proteínas en el sistema de expresión para ser usados como “factorías celulares”. La expresión se inicia con la translocación hacia el lumen del retículo endoplásmico (RE), donde experimentan modificaciones covalentes; procesamiento, formación de enlace disulfuro, glicosilación y degradación, antes de continuar hacia el aparato de Golgi, donde experimentarían más modificaciones y luego son secretados (Indiris *et al.*, 2010)

Se clonó en *E. coli*, cepa DH5 α , una PLA₂ ácida antitumoral y bactericida (Roberto *et al.*, 2004a), posteriormente se clonó y expresó una PLA₂ ácida inhibidora de agregación plaquetaria del veneno de la serpiente *B. jararacussu* empleando el vector de expresión pET11a (+) y la cepa de *E. coli* BL21, la proteína recombinante mantuvo su actividad de inhibición plaquetaria (Roberto *et al.*, 2004b). Por otro lado, se empleó el sistema de *P. pastoris*, cepa KM71H, y el vector de expresión pPicZ α A en la PLA₂ homóloga de la serpiente *B. pauloensis*, el cual mantuvo sus efectos biológicos igual que la proteína nativa (De Lima, 2013).

El caso del vector pGEM-T y empleando a *E. coli* para el clonamiento de una PLA₂ ácida miotóxica e inhibidora de la agregación plaquetaria fue utilizado para el análisis estructural (Barbosa *et al.*, 2013). Asimismo, una PLA₂ homóloga miotóxica, fue clonado en el vector pCI y en *E. coli* (cepa zul-XL1) para el análisis estructural (Nuñez *et al.*, 2004). Por el contrario, empleando a *P. pastoris*, para expresar una glicoproteína ácida rDMA64, aislado de la especie *Didelphis aurita*, inhibe a las toxinas de las serpientes del género *Bothrops*, en particular de las miotoxinas PLA₂.

Se demuestra que la DM64 y rDM64 muestran un patrón diferente de glicosilación, aunque la recombinante inhibió la citotoxicidad de K49PLA₂ en un 92 %, del veneno de la serpiente de *B. asper* (Vieira *et al.*, 2017). Asimismo, se ha expresado fosfolipasas A₂ de diferentes especies empleando el sistema bacteriano, como la Lys49PLA₂ homologa miotóxica, conservando su función (Giuliani *et al.*, 2001) y la PLA₂ básica homologa (de Oliveira *et al.*, 2003).

Por otra parte, Zhang *et al.* (2006), emplearon varios sistemas para la expresión de una PLA₂, tales como: el sistema de expresión en células de insectos, en la cual se obtuvo altos niveles y fuerte actividad enzimática de la proteína recombinante, asimismo se probó en el sistema de *P. pastoris* y *E. coli*, llegando a purificar en un solo paso la proteína recombinante en *P. pastoris*, mientras que en baculovirus se purificó en dos pasos. Así mismo, se expresó exitosamente una PLA₂ de la bacteria *Streptomyces violaceoruber* en *P. pastoris*, manteniendo su actividad enzimática (Liu *et al.*, 2015). Además, se expresó una proteína similar a trombina llamado Ancrod, una droga anticoagulante, en *P. pastoris*, la cual mantuvo su actividad fibrinogenolítica tanto igual como la proteína nativa (Yu *et al.*, 2007)

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. HIPÓTESIS

- Hipótesis nula: La fosfolipasa A₂ ácida presente en el veneno de *Bothrops atrox* no tiene ninguna relación en la miotoxicidad y no sería posible su clonamiento.
- Hipótesis alterna: La fosfolipasa A₂ ácida presente en el veneno de *Bothrops atrox* tiene relación en la actividad miotóxica y sería posible su clonamiento.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. **Objetivo general**

- Caracterizar, clonar a la PLA₂ ácida del veneno de la serpiente de *B. atrox* y su relación en la actividad miotóxica

3.2.2. **Objetivos específicos**

- Purificar a la PLA₂ ácida a partir del veneno total usando métodos cromatográficos convencionales y automatizados.
- Determinar el peso molecular y punto isoeléctrico teórico
- Establecer la relación de la PLA₂ ácida en la actividad miotóxica.
- Determinar la secuencia del gen de la PLA₂ ácida a partir de su cDNA.
- Determinar el modelamiento estructural teórico de la PLA₂ ácida.
- Clonar el gen de PLA₂ ácida y realizar los ensayos preliminares de expresión en *Pichia pastoris*.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIALES

4.1.1. Materiales biológicos

4.1.1.1. Serpiente

Se emplearon especímenes de la serpiente *Bothrops atrox* llamada comúnmente “Jergón de la Selva” (figura 11) identificado por MV. Walter Silva (SERFOR), y procedente de la región de Alto Maraón, ubicado en el departamento de Amazonas - Perú y mantenido en cautiverio en el serpentario “Oswaldo Meneses” del Museo de Historia Natural-UNMSM.



Figura 11. Serpiente *Bothrops atrox* de Perú. Foto: Maik Dobiey (Fuente: Navarrete *et al.*, 2010)

4.1.1.2. Animales de experimentación

Se emplearon ratones albinos (cepa Balb/c), proporcionados por el Instituto Nacional de Salud (INS), Lima-Perú. Los cuidados éticos de los animales fueron en base a la Guía de Principios Internacionales para la Investigación Biomédica en Animales (1985), por el Concejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas (COIMS).

4.1.2. **Materiales de laboratorio**

4.1.2.1. Caracterización bioquímica

a) Resinas, reactivos y tampones (buffer) para las columnas cromatográficas:

- Sephadex G-75 (Sigma Chemical Co.)
- DEAE-Sephadex A-50 (Sigma Chemical Co.)
- ENrichQ (Bio-Rad)
- Tampón acetato de amonio 0.05 M pH 6.4
- Tampón acetato de amonio 0.05 M pH 6.4, mas NaCl 0.3 M
- Tampón acetato de amonio 0.05 M pH 6.4, mas NaCl 0.6 M
- Tampón acetato de amonio 0.05 M pH 6.4, mas NaCl 1.0 M
- Agua grado cromatográfico (Merck-MilliPore)
- Etanol 20 % (Merck-MilliPore)
- Membranas de diálisis (Sigma)

b) Sustratos, reactivos, tampón para la actividad enzimática y su cuantificación:

- Yema de huevo
- Fosfatidilcolina (Sigma Chemical)
- Tampón Tris-HCl 10 mM y CaCl_2 10 mM a pH 7.4 (Sigma Chemical)
- Tritón X-100 0.1 M (Sigma Chemical)
- Rojo fenol 0.8 mM (Sigma Chemical)
- Tampón Tris-HCl 0.1 M, pH 8.5 (Sigma Chemical)
- CaCl_2 0.2 M (Calbiochem)
- NaCl 1.0 M (Merck)
- Etanol puro (Merck)
- Folin-Ciocalteu (Sigma Chemical)
- Solución alcalina (tartrato de sodio, carbonato de sodio y sulfato de cobre)
- Proteína albumina sérica bovina

c) Soluciones, tampón y reactivos para SDS-PAGE:

- Acrilamida (Sigma Chemical)
- Bis-acrilamida (Fuka)
- Dodecil sulfato de sodio (SDS), (Sigma Chemical)
- Tetrametiletlenodiamina (TEMED), (Sigma Chemical)
- Persulfato de amonio (Sigma Chemical)
- Azul bromofenol (Sigma Chemical)
- Azul brillante de Coomassie R-250 (Sigma Chemical)
- Solución decolorante (metanol, etanol puro, ácido acético glacial) (Merck)
- β -Mercaptoetanol 0.5 % (Sigma Chemical)
- Marcador de proteína PageRuler Prestained (ThermoScientific)
- Tampón de corrida: Tris 3 %, glicina 14.4 %, SDS 1 %
- Tampón Tris-HCl 1.0 M, pH 8.8 (Sigma Chemical)
- Tampón Tris-HCl 1.0 M, pH 6.8 (Sigma Chemical)

4.1.2.2. Caracterización molecular

a) Reactivos para el aislamiento de RNA total:

- Reactivo TRizol (Invitrogen)
- Isopropanol (Sigma)
- Etanol 75 % (Merck)
- Cloroformo (Merck)
- Agua miliQ grado molecular (Invitrogen)

b) Reactivos, kits comerciales para la síntesis y amplificación de cDNA:

- Kit SuperScrip III (Invitrogen™)
- Oligo (dT)₁₈ (Invitrogen)
- Taq DNA Polimerase Rec (Invitrogen™)
- dNTPs y MgCl₂ (Invitrogen)
- Buffer de la Taq DNA Polimerasa Rec (Invitrogen™)

- Agua (MilQ), grado molecular (Invitrogen™)

c) Reactivos para electroforesis en gel de agarosa:

- Agarosa al 1 % (Calbiochem)
- Tampón TBE 10X (Tris, Ácido bórico, EDTA) (ThermoScientific)
- Tampón TAE 10X (Tris, Acetato, EDTA)
- Marcador de bajo peso molecular 100 pb DNA (ThermoScientific).
- Colorante RedGel (10,000X)

4.1.2.3. Ensayo de mitotoxicidad

a) Reactivos y kit comercial:

- Kit CK-NAC FS* (DiaSys, GmbH-Germany)
- Citrato de sodio 3.8 %
- Solución salina (NaCl 0.9 %)

4.1.2.4. Clonamiento y expresión

a) Reactivos y kits comerciales:

- Kit de EasySelect™ Pichia Expression (Invitrogen™)
- Kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen™)
- Kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro (ThermoScientific™)
- Kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (ThermoScientific™)
- Enzimas de restricción: *EcoRI*, *NotI* y *SaI* (Invitrogen™)
- La enzima de restricción *PmeI* (New England BioLab Inc.)
- Marcador de alto peso molecular 1kpb para DNA (ThermoScientific™)
- Kit DNA Ligasa (Invitrogen™)
- Medio solido y líquido LB (Luria-Bertani) bajo en sal
- Medio líquido YPDS (extracto de levadura, peptona, dextrosa, sorbitol)
- Medio Agar YPDS más Zeocina™
- Glicerol puro (Sigma)

- Dextrosa (Sigma)
- Agar (Merck)
- Peptona (Merck)
- Triptona (Merck)
- NaCl (Merck)
- Sorbitol 1.0 M (Sigma)

4.1.2.5. Equipos

- Electroporador MicroPulser™ (Bio-Rad)
- Espectrofotómetro Genesys5 (Spectronic Ins.)
- Termociclador en punto final (Eppendorf Mastecycler)
- Termociclador en gradiente de temperatura (TurboCycler Blu-Ray)
- Equipo de electroforesis vertical (Cleaver Scientific Ltd)
- Fuente de poder (Cleaver Scientific Ltd)
- NanoDrop Lite Spectrophotometer (ThermoScientific)
- Transluminador UV (Cleaver Scientific Ltd)
- Cabina con UV para PCR (CRUMA)
- Cabina con flujo laminar (ESCO)
- Incubadora con temperatura (ECOSHEL)
- Termoblot AccuBlock™ Digital Dry Bath (Labnet inc)
- Centrífuga refrigerada (Centurion)
- Ultra congeladora -80 °C (ThermoScientific)
- Colector automático de fracciones (Farmacia-LKB SuperFrac)
- Cámara de electroforesis Mini-PROTEAN TetraCell, 4-Gel System (Bio-Rad)
- Fuente de poder para electroforesis (Bio-Rad)
- Baño de temperatura (Mettler)
- Sistema cromatográfico líquido automatizado de presión media (Bio-Rad)
- Incubadora con Shaker y temperatura (BIOBASE)
- Colector automático de fracción (Bio-Rad)
- Balanza analítica (ADAM)
- pH metro (HANNA)
- Centrífuga (Modelo Easy Spin)

4.2. METODOLOGÍAS

4.2.1. Extracción del veneno de *Bothrops atrox* “Jergón de la selva”

La extracción del veneno fue por presión manual de las glándulas de veneno de la cabeza del animal e introduciendo sus colmillos en un beaker para la expulsión del veneno. El veneno fue liofilizado y conservado a 0 °C, hasta su empleo en la etapa bioquímica y molecular.

4.2.2. Purificación de la enzima BaPer-PLA_{2a}

Sistema cromatográfico convencional

Se resuspendió 120 mg de veneno liofilizado en tampón acetato de amonio 50 mM a pH 6.4, el cual fue homogenizado y centrifugado a 4000 rpm por 20 min para eliminar restos insolubles. El sobrenadante en un primer paso fue aplicado a una columna cromatográfica de intercambio aniónico DEAE-Sephadex-A50 (16.5 cm x 1.8 cm) equilibrada con tampón de elución acetato de amonio 50 mM a pH 6.4, con un flujo de ~12 mL/h. Para eluir las proteínas ligadas a la resina se cambió el tampón isocrático a otros que contenían NaCl 0.3 M y 0.6 M. Aquellas fracciones que mostraron actividad enzimática, fueron homogenizadas y concentradas en membranas de diálisis para aplicarlas en un segundo paso en una columna cromatográfica de exclusión molecular Sephadex-G75 (58 cm x 1.5 cm), equilibrada con tampón acetato de amonio 50 mM a pH 6.4 a un flujo de ~14 mL/h, colectando fracciones de 2 mL.

Sistema cromatográfico líquido automatizado de presión media-NGC (MPLC)

En este tercer paso el MPLC, equipado con una bomba para la aplicación de muestra y un colector de fracción automatizado. Se utilizó una columna de intercambio aniónico ENrichQ (5x50 mm), equilibrado con el tampón de elución de acetato de amonio 50 mM a pH 6.4 (tampón A) y el mismo tampón conteniendo NaCl 1.0 M (tampón %B). Este paso cromatográfico se realizó a una temperatura de 22 °C. Asimismo, todos los tampónes fueron filtrados (0.22 µm) y las columnas fueron degasificadas empleando etanol al 20 %. La muestra fue monitoreada a absorbancia de 280 nm y la concentración de sal fue medido por conductividad

(mS/cm). Se inició con el tampón A por 8 min hasta la culminación de la elución isocrática, seguido del tampón %B por 15 min, generando una gradiente de NaCl desde 0.1 hasta 1.0 M (figura 12).

4.2.3. **Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de las proteínas totales del veneno y la enzima purificada (BaPer-PLA₂) fueron realizadas por dos metodologías: La absorción de luz ultravioleta y método de Lowry:

Cuantificación por absorción de luz ultravioleta

La medición fue realizada por la absorción de luz ultravioleta a 280 nm (Warburg y Christian, 1941), para lo cual fue empleado un espectrofotómetro Genesys5 UV/Visible (Spectronic). Se empleo una curva de calibración de albumina para hacer la conversión de nm hacia microgramos.

Cuantificación por el método de Lowry

El método de Lowry *et al.* (1951), se basó en el uso de una solución alcalina (tartrato de Sodio 4 %, carbonato de sodio 4 % y sulfato de cobre 2 %), el reactivo de Folin-Ciocalteu en la relación de (1/6) y albumina sérica bovina como proteína estándar. En un tubo de ensayo se agregó un volumen de 0,1 hasta 0,5 mL de la muestra, luego se agregó la solución alcalina 2 mL y se incubó a 37 °C por 15 min. Posteriormente, se adicionó 0,5 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu y se registró la absorbancia a 660 nm. Además, se realizó una curva de calibración de albumina para obtener los µg de la proteína en estudio.

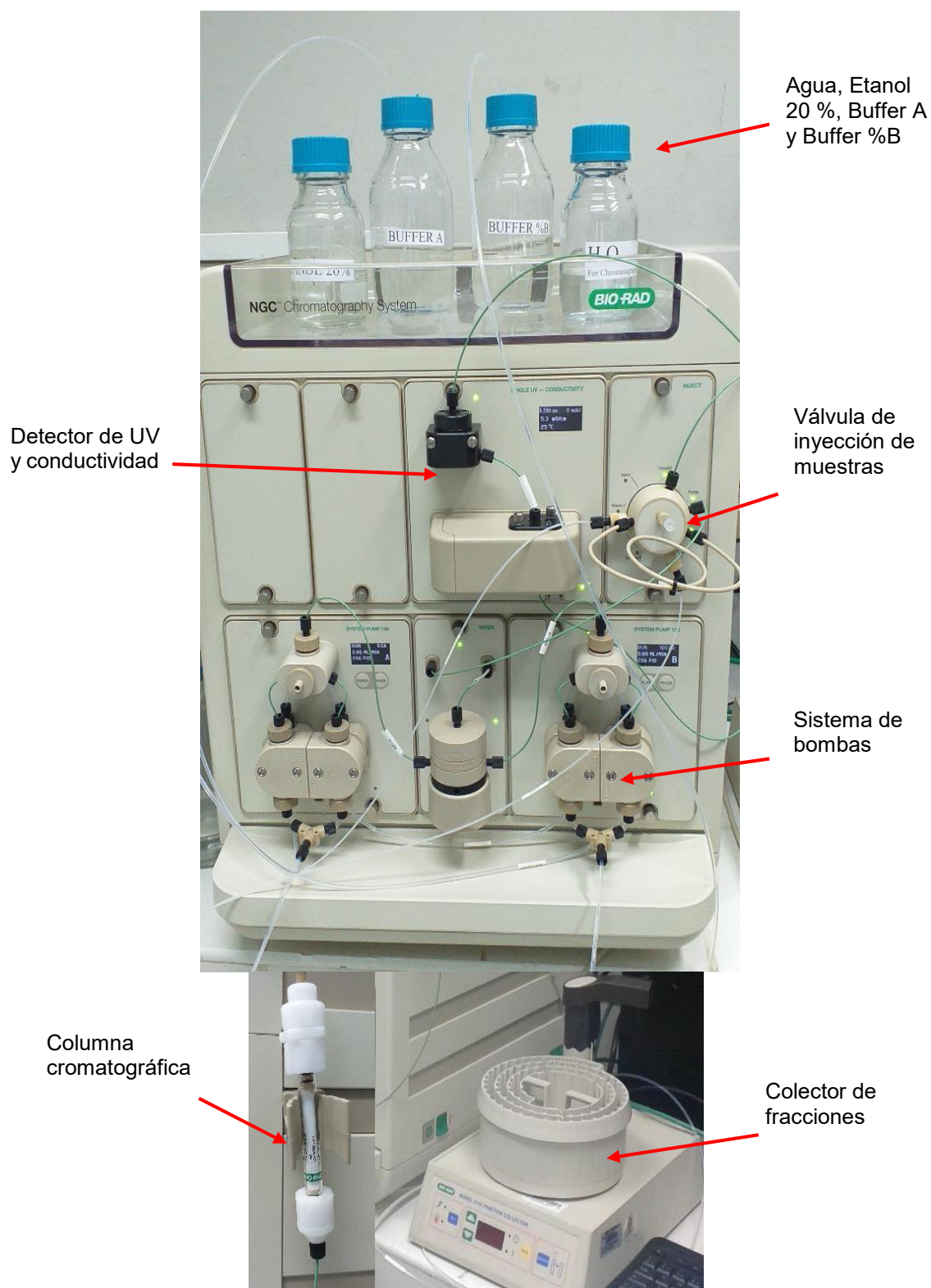


Figura 12. Sistema cromatográfico líquido de presión media (MPLC). Las principales partes del sistema son descritas en la imagen. Esta corrida fue realizado a un flujo de 0.8 mL/min y colectando fracciones de un volumen de 0.5 mL.

4.2.4. Actividad enzimática

Se determinó la actividad enzimática de la fosfolipasa A₂ ácida empleando el método descrito por Vidal y Stoppani (1971), para la cual se utilizó el sustrato que consistió en emulsión de yema de huevo al 45 % en tampón Tris-HCl 10 mM pH 7.4 conteniendo CaCl₂ 10 mM. Se empleó 1.5 mL de sustrato con 100 µL de veneno crudo o 50 µL de la proteína purificada. La mezcla fue incubada en un baño maría a 37 °C por 15 min y luego se sometió a un baño de agua a 100 °C para medir el tiempo de coagulación. La actividad específica se expresó como el tiempo de retardo en la coagulación de la emulsión por minuto y miligramo de proteína (U/mg).

Por otro lado, también, se evaluó la actividad enzimática con el sustrato fosfatidilcolina de acuerdo a la metodología descrita por (Araujo y Radvanyi, 1987; Oliveira y Palma, 1998), dicha metodología fue modificada a las condiciones del laboratorio por Lazo *et al.* (1998). Se preparó la solución que contenía tritón X-100 7.0 mM, rojo fenol 0,0275 mM, tris-HCl 3.0 mM pH 8.5, CaCl₂ 10 mM, NaCl 100 mM y fosfatidilcolina 3.5 mM, para un volumen total de 1 mL. Luego, se procedió a una incubación a 37 °C por 5 min y después la mezcla de reacción se trasladó a una cubeta de un 1 mL agregándose 20 µL de la enzima. En estas condiciones, se monitoreo la absorbancia a 558 nm en cada minuto hasta los 6 min. La actividad enzimática fue expresada en µmoles de ácidos grasos liberados por minuto (UA) y por miligramos de proteína.

4.2.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Se procedió de acuerdo a la metodología descrita por Laemmli (1970). La enzima purificada fue tratada previamente a 100 °C por 5 min para su denaturación. Asimismo, se preparó los tampónes Tris-HCl 1.0 M de pH 6.8 y 8.8, un gel de poliacrilamida al 15 % y se corrió en condiciones reductoras (0.5 % β-mercaptoetanol) y no reductoras a 100 V en un sistema de electroforesis vertical Mini-PROTEAN Tetra Cell, 4-Gel System (Bio-Rad). La tinción del gel fue con Azul brillante de Coomassie R-250 por 15 min y la revelación de las bandas se obtuvo por decoloración con una mezcla de: metanol, etanol, ácido acético glacial y agua

en una relación de 2:1:5:6.5, respectivamente. Se empleó como patrón de bandas proteicas el marcador PageRuler Prestained de 10-170 kDa (ThermoScientific).

4.2.6. **Actividad miotóxica**

Se emplearon ratones albinos de la cepa Balb/c (18-22 g). Se formaron cuatro grupos experimentales con tres ratones (triplicado) por grupo los cual se aplicó los cuidados éticos (COIMS). Los ratones fueron mantenidos en los ambientes del bioterio del Instituto de Medicina Tropical Daniel A. Carrión de la UNMSM.

Al primer grupo recibió una inyección intramuscular de la enzima purificada en estudio (BaPer-PLA_{2a}) (30 µg/100 µL) en el músculo gastrocnemius. Al segundo grupo se le inyectó la PLA₂ básica miotóxica (20 µg/100µL). El tercer grupo recibió la combinación de BaPer-PLA_{2a} y la PLA₂ básica miotóxica (5 µg + 20 µg en 100 µL), respectivamente, y al cuarto grupo se le utilizó como control negativo, empleándose 100 µL de solución salina (NaCl, 0.9 %). Luego de cumplido las 3 h de inoculación, se anestesió con cloroformo a los ejemplares y se procedió a recolectar la sangre de la vena facial que fue recibida en tubos de 1.5 mL conteniendo 40 µL de citrato de sodio al 3.8 %. La sangre fue centrifugada a 2000 rpm por 10 min para la obtención del plasma que contenía creatina quinasa (CK). Para medir la actividad de creatina quinasa se utilizó el kit CK-NAC FS* (DiaSys, GmbH-Germany), donde se empleó 40 µL de plasma con 1 mL del kit. La lectura de absorbancia en el espectrofotómetro fue registrada a 340 nm, y la actividad de CK fue expresada en U/L.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la actividad enzimática y miotóxica fueron tomados como un promedio \pm desviación estándar (DS), mientras que para el análisis estadístico se usó el programa Minitab16 <https://www.minitab.com/es-mx/>.

4.2.7. **Caracterización molecular**


4.2.7.1. Diseño de cebadores

Los cebadores se diseñaron a partir de una búsqueda de secuencias nucleotídicas de PLA₂ ácidas depositadas en GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, y usando el programa Blastn <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> para el

alineamiento de las secuencias nucleotídicas de PLA₂ ácidas de diferentes serpientes: *Bothrops moojeni* (HQ327311), *B. neuwiedi pauloensis* (GQ850458), *B. asper* (MF319968), *B. jararacussu* (AY145836), *B. diporus* (JQ661499; JQ661500) y de *B. erythromelas* (DQ359953). Luego, se usó los programas ClustalW <http://www.clustal.org/> y MEGAX <https://www.megasoftware.net/> para desarrollar el alineamiento múltiple de dichas secuencias, y del cual diseñar los cebadores específicos para la fosfolipasa A₂ ácida en estudio. Además, se usó la plataforma de Swiss-Prot <https://www.uniprot.org/statistics/Swiss-Prot> para hacer una búsqueda adicional de secuencias de aminoácidos de PLA₂ ácidas.

Se diseñaron manualmente dos pares de cebadores tomando en cuenta los parámetros para optimizar la especificidad, como el contenido GC % que están entre el 40-60 %, la temperatura *melting* (T_m) sea un valor similar y la longitud de los cebadores (18-24 nucleótidos), así como tomando en cuenta la región conservada y no traducidas del inglés *UnTranslated Region* (UTRs) ubicados en los extremos del gen de la fosfolipasa A₂ ácida secretora (PLA₂) y sintetizados por el fabricante Invitrogen (Tabla 3). Para encontrar los parámetros y evitar la formación de dímeros o autodímeros se usó *OligoAnalyzer Tool* <https://www.idtdna.com/pages>.

Tabla 3. Lista de cebadores para la amplificación de la PLA₂ ácida nativa por PCR

Cebadores	Secuencias: 5'  3'	Longitud	GC%	T _m
F1-BAPLA2	ATGAGGACTCTCTGGATAGTGA	22	45	60.5
R1-BAPLA2	TTAGCATGGCTCTGCCTTCT	20	50	62.4
F2-BAPLA2	ATGAGGACTCTCTGGATAATGGC	23	47.8	62.3
R2-BAPLA2	TTAGCATGGCTCTGATTCC	19	47.4	58.1

4.2.7.2. Aislamiento de RNA total

Se utilizó tres muestras de veneno liofilizado de *B. atrox*, y siguiendo el protocolo de ácido tiocianato de guanidino-fenol-cloroformo para aislar RNA total, desarrollado por Chomczynski y Sacchi, (1987) y adaptado por el fabricante de

TRizol™ (Invitrogen™). Adicionalmente, se empleo una muestra de tejido glandular de *B. atrox*.

- A 40 mg de veneno liofilizado (65 mg de tejido glandular de veneno) se le agregó 1 mL de TRizol™ (ambion) y se homogenizó por 5-10 min a temperatura ambiente.
- De inmediato se le agregó 0.2 mL de cloroformo y se dejó incubando por 4-5 min y luego se centrifugó a 12.000xg por 15 min.
- Se transfirió la fase acuosa conteniendo el RNA total a otro tubo, se agregó 0.5 mL de isopropanol, se incubó por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000xg por 10 min.
- Se descartó el sobrenadante y al precipitado de RNA total (pellet) se procedió a lavar con 1 mL de etanol al 75 %.
- Luego, se descartó el etanol y se dejó secando el pellet por inversión a temperatura ambiente.
- Finalmente, el RNA total fue resuspendido en 30 µL de agua ultra pura grado molecular (Invitrogen™) libre de RNAsa.
- Posteriormente, se dejó incubar el pellet en AccuBlock Digital Dry Bath (Labnet) a 59 °C por 15 min.
- La cuantificación se realizó en un equipo Nanodrop Lite Spectrophotometer (ThermoScientific), para calcular la concentración (ng/ µL) y se considero la relación A260/A280 para la calidad de RNA total.
- Las muestras de RNA total fueron almacenadas a -20 °C para su uso posterior.

4.2.7.3. Síntesis de cDNA

En la siguiente etapa de síntesis de la primera hebra de cDNA se siguió el protocolo del fabricante del kit SuperScript™ III (Invitrogen). Para ello, se procedió con la transcripción reversa en PCR (*Reverse Transcriptase*, RT-PCR) basado con el cebador universal de mRNA, Oligo (dT)₁₈₋₂₀ el cual está constituido por una cadena de polinucleótidos, entre 18 a 20 pares bases de timina, la que es complementaria a la cola poliadeninas en el extremo 3' de los mRNA. Los reactivos, condiciones de concentración inicial, final y volúmenes son detallados en la tabla 4.

Tabla 4. Reactivos y concentraciones empleados en la RT-PCR.

Reactivos	[] inicial	Volúmen (μL)	[] final
H ₂ O _(mQ)	-	10.2	-
dNTPs	10 mM	1.0	0.5 mM
Oligo (dT) ₁₈₋₂₀	0.5 μg/μL	0.6	300 ng
RNA _t	104 ng/μL	1	104 ng
Tampón <i>first Strand</i>	5X	4.0	1X
DTT	0.1 M	1.0	5 mM
SuperScript III	200 U/μL	1.0	200 U
Volúmen total		19 μL	

Las etapas, condiciones de temperatura y tiempo en el termociclador para la RT-PCR, son detallados en la tabla 5.

Tabla 5. Etapas y condiciones de temperatura de la RT-PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Time (min)
1	65	5
2	4	1
3	50	45
4	70	15
Total		66 min

La cuantificación se realizó usando el equipo Nanodrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific), para calcular la concentración y calidad del cDNA.

4.2.7.4. Amplificación del gen de BaPer-PLA_{2a} por la PCR y su secuenciamiento.

La amplificación del gen de la PLA₂ del veneno de la serpiente *B. atrox* por reacción en cadena de la polimerasa fue realizado en un termociclador (Eppendorf). La reacción fue realizada empleado los cebadores *forward* F1-BAPLA2 y *reverse* R1-BAPLA2. La PCR fue llevado a cabo con una *Taq* DNA Polimerasa Rec (*Thermus aquaticus* (*Taq*)). Los reactivos, concentración inicial, final y volúmenes se detallan en la tabla 6.

Tabla 6. Se muestra los reactivos y concentraciones de la PCR.

Reactivos	[] inicial	R(x) ₁ (μL)	[] final
H ₂ O (mQ)	-	16.7	-
MgCl ₂	25 mM	2.0	2.0 mM
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
F1	10 μM	1.0	0.4 μM
R1	10 μM	1.0	0.4 μM
Tampón de la <i>Taq</i> Pol	10 X	2.5	1 X
<i>Taq</i> Polimerasa	5 U/μL	0.3	1.5 U
cDNA	100 ng/μL	1.0	100 ng
Volúmen total		25 μL	

(*) también se usó el segundo par de cebadores diseñados.

Por otro lado, las etapas, temperatura, tiempo y ciclos durante la amplificación son detallados en la tabla 7.

Tabla 7. Etapas y condiciones en la PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	40 s	33
<i>Annealing</i>	56	45 s	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	6 min	1
Mantenimiento	4	-	

Finalmente, el producto de PCR fue corrido en un gel de agarosa (1.2 %) con tampón TBE 1X en un sistema de electroforesis (Cleaver Scientific Ltd). Luego, el gel fue teñido con GelRed (0.01 %) y observado en un transluminador UV (Cleaver Scientific Ltd). El peso molecular del amplicón fue estimado con el marcador GenRuler 100 pb DNA (ThermoScientific).

Para el secuenciamiento, los productos de PCR fueron extraídos de gel de agarosa de acuerdo al protocolo del fabricante del kit GeneJET Gel Extracción and DNA Cleanup Micro (ThermoScientific) y enviados para el secuenciamiento por el método EZ-Seq, realizado por la empresa MacroGen, Inc. (Corea del Sur).

4.2.8. Análisis bioinformático

El análisis bioinformático permitió analizar las secuencias recibidas de Macrogen (Corea del Sur) para alinear y generar las secuencias consenso de nucleótidos usando MEGAX, <https://www.megasoftware.net/>, su traducción a aminoácidos fue usando *Translate tool* de la plataforma ExPASy <https://web.expasy.org/translate>, y la obtención del punto isoeléctrico teórico fue usando a protparam <https://web.expasy.org/protparam/>. Además, para la identificación de la proteína dentro de las superfamilias de PLA₂ y dominios conservados en la estructura primaria de la proteína en estudio fue utilizando <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>. Asimismo, el desarrollo del alineamiento múltiple BaPer-PLA_{2a} con diferentes fosfolipasas A₂ ácidas de diferentes serpientes del género *Bothrops* sp. fue usando Clustal W y MEGAX <https://www.megasoftware.net/>.

Por otro parte, el desarrollo del modelamiento estructural teórico de BaPer-PLA_{2a} fue a partir de un modelamiento comparativo usando los programas Robetta new.robetta.org y Modeller <https://salilab.org/modeller/>. Posteriormente, se buscó la secuencia de la proteína con la cual presentó más homología estructural en el *Protein Data Bank* www.rcsb.org y se desarrolló el modelamiento tridimensional usando el programa SWISS-MODEL <https://swissmodel.expasy.org>. Asimismo, este último programa proporcionó el diagrama de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963).

4.2.9. Análisis filogenético de la BaPer-PLA_{2a}

El análisis filogenético se basó en el empleo de secuencias de aminoácidos de diferentes fosfolipasa A₂ ácidas y algunas básicas de diferentes serpientes, principalmente del género *Bothrops* sp. Para ello, se empleó el método de Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987), el cual se basó en la distancia-p para crear el árbol evolutivo más óptimo de las secuencias. Se procedió a realizar el alineamiento múltiple con ClustalW y MEGAX <https://www.megasoftware.net/>.


4.2.10. Clonamiento de PLA_{2a} en *E. coli* (Top10F')

4.2.10.1. Construcción del vector de expresión

Diseño de cebadores con adaptadores

Se diseñaron dos pares de cebadores; F1-EDBAaPLA2, R1-EDBAaPLA2, F2-EDBAaPLA2 R2-EDBAaPLA2, las cuales presentan sitios específicos para el reconocimiento de las enzimas de restricción: *EcoRI*, *Sall* y *NotI*. Además, el kit del vector de expresión incorpora dos cebadores específicos al vector. En la tabla 8, se indica los códigos de los cebadores y las secuencias en colores los sitios de restricción de las enzimas.

Tabla 8. Lista de cebadores para el clonamiento.

Cebadores	Secuencia: 5'  3'
F1-EDBAaPLA2	CGGAATTC AACCTGGTGCAATTTGAGACGTTG
R1-EDBAaPLA2	GCCTCGAC GCATGGCTCTGCTTCTTCC
F2-EDBAaPLA2	CGGAATTC AACCTGATCCAATTTGAGACGTCG
R2-EDBAaPLA2	GCCTCGCCGC GCATGGCTCTGATTCCTCC
3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC
5' AOX1	GACTGGTTCCAATTGACAAGC

(*) los colores amarillo, verde y celeste indican los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción *EcoRI*, *Sall* y *NotI*, respectivamente.

Amplificación de PLA_{2a} por PCR

La amplificación del gen PLA_{2a} del veneno de *B. atrox*, se realizó por PCR a partir del cDNA obtenido previamente del veneno liofilizado. Se emplearon ambos cebadores con adaptadores para la creación de los extremos adhesivos cuya digestión fueron por las enzimas de restricción *EcoRI*, *Sall* y *NotI*. Además, se empleó la *Phusion High-Fidelity* DNA polimerasa (ThermoScientific) para la amplificación del gen. A continuación, se muestran los reactivos y concentraciones empleados en la reacción en la tabla 9.

Tabla 9. Reactivos y concentraciones en la PCR.

Reactivos	[] inicial	Volúmen (μL)	[] final
H ₂ O _(mQ)	--	16.1	--
Tampón Phusion HF	5 X	5	1 X
dNTPs	10 mM	0.5	0.2 mM
F1-EDBAaPLA2	10 μM	1	0.4 μM
R1-EDBAaPLA2	10 μM	1	0.4 μM
cDNA	100 ng/ μL	1	100 ng
Phusion High-Fidelity DNA polimerasa	2 U/ μL	0.4	0.8 U
Volúmen total		25 μL	

(*) También, se usó el segundo par de cebadores y la *Taq* DNA polimerasa estándar.

Las etapas, condiciones de temperatura, tiempo y ciclos durante la amplificación se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Etapas y condiciones en la PCR

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	N° ciclos
Desnaturalización inicial	95	3 min	1
Desnaturalización	95	40 s	33
<i>Annealing</i>	59	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	6 min	1
Mantenimiento	4	--	

Electroforesis y purificación de las amplificaciones de PLA_{2a}

Para corroborar el tamaño del amplicón se realizó una electroforesis horizontal para lo cual, se procedió a preparar un gel de agarosa al 1.2 %, teñido con GelRed. La mezcla contenía los siguientes componentes: 40 mL de tampón TAE 1X, 480 mg de agarosa y 1 μL de GelRed™, este último fue previamente preparado. Las muestras se homogenizaron con el buffer de carga (azul bromofenol, cianol xylene y orange g) en una relación de 1:5, respectivamente. Posteriormente, la electroforesis se desarrolló usando el tampón de corrida TAE 1X a 100 V por 60 min.

Por otro lado, los amplificados fueron purificados de acuerdo al protocolo del kit GeneJET Gel Extracción and DNA Cleanup Micro (Thermo Scientific), el proceso del mismo se describió previamente. Asimismo, los amplificados fueron cuantificados usando NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Scientific) para determinar concentración y calidad del DNA a A260/A280.

Digestión del amplicón de PLA_{2a}

La digestión del amplicón fue realizado con las enzimas de restricción de *EcoRI* y *SaI* (ThermoScientific™). La digestión se desarrolló primero con la enzima *SaI* a 37 °C por 3 h y después, se agregó la segunda enzima de restricción *EcoRI* a la misma temperatura por un tiempo entre 5 a 8 h. Esto permitió generar los extremos cohesivos del amplicón y los reactivos usados para la digestión se describen en la tabla 11.

Tabla 11. Los reactivos y concentración para la digestión de la PLA_{2a}.

Reactivos	[] inicial	Volúmen (µL)	[] final
H ₂ OmQ	-	8	-
Tampón (O)	10 X	2	1 X
cDNA	33.4 ng/ µL	9	300 ng
<i>SaI</i>	10 U/ µL	1	10 U
<i>EcoRI</i>	10 U/ µL	1.5	15 U
Volúmen total		21.5 µL	

(*) También, se uso la enzima de restricción *NotI* y *EcoRI*.

El producto fue purificado utilizando el kit GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro (Thermo Scientific).

Digestión del plásmido pPicZαA

El plásmido fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *SaI* a una incubación de 37 °C por 3 h mientras que, la inactivación de las enzimas fue a 80 °C por 20 min. Los reactivos, concentraciones y volúmenes son descritos en la tabla 12.

Tabla 12. Reactivos y concentración en la digestión del plásmido.

Reactivos	[] inicial	Volúmen (μL)	[] final
H ₂ O _{mQ}	-	37	-
Tampón (O)	10 X	5	1 X
pPicZαA	0.5 μg/ μL	4	2 μg
<i>Eco</i> RI	10 U/ μL	2	20 U
<i>Sa</i> II	10 U/ μL	2	20 U
Volúmen total		50 μL	

(*) también se ensayo el plasmido con la digestión de las enzimas de restricción *Eco*RI y *Not*I.

El producto fue purificado utilizando el kit Genjet Gel Extraction and DNA Cleanup Micro (ThermoScientific) (figura 13).

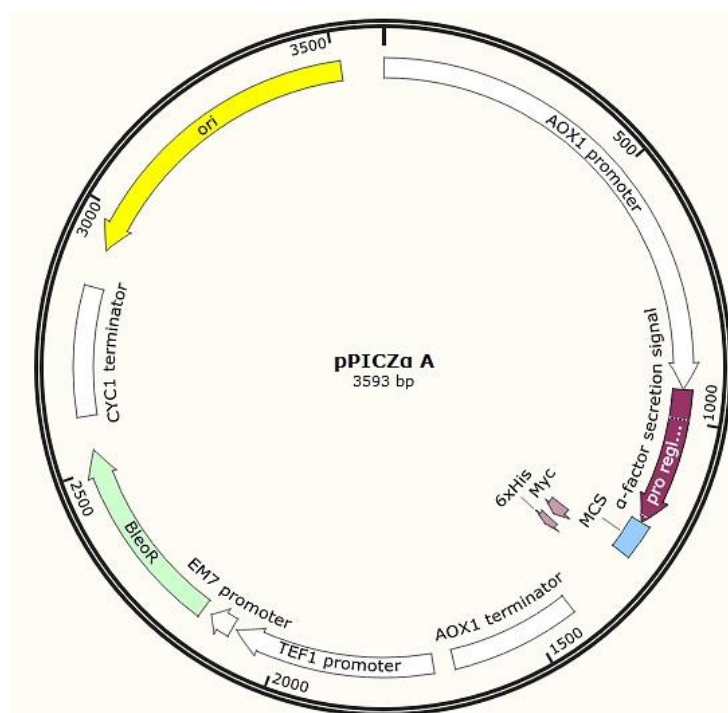


Figura 13. Características del vector pPicZαA (Fuente: SnapGene)

Ligación entre la PLA_{2a} y pPicZαA

La reacción de ligación entre el gen de la fosfolipasa A₂ ácida (PLA_{2a}) y el plásmido pPicZαA, previamente digeridos, fue realizada con T4-DNA ligasa (Invitrogen™). La

reacción fue estandarizada ensayando con diferentes relaciones de inserto: vector para conseguir la ligación. Los reactivos, concentración y distintas condiciones de ligación se detallan en la tabla 13.

Tabla 13. Reactivos y concentración para la ligación.

Reactivos	[] inicial	Ligaciones		
		L1	L2	L3
H ₂ O _(mQ)		10.7 µL	10.35 µL	9.6 µL
Tampón de ligación	5 X	4 µL	4 µL	4 µL
Relación Inserto:Vector		3:1	5:1	6:1
Vector pPicZαA	77.8 ng/µL	1.9 µL	1.55 µL	1.3 µL
Inserto DNA (ES)	26.6 ng/ µL	2.4 µL	3.1 µL	3.1 µL
T4 DNA ligasa	1 U/ µL	1 µL	1 µL	1 µL
Volúmen total		20 µL	20 µL	20 µL

(*) La incubación se realizó a 18 °C por 16 h (toda la noche).

4.2.10.2. Preparación de células competentes (Top10F') por CaCl₂

El protocolo se basó en las instrucciones del fabricante del kit EasySelect™ *Pichia* Expression (Invitrogen), (Higgis y Creeg, 1998; Cregg, 2007; Gomes de Lima, 2013). Se inició a partir de un pre inóculo de la bacteria Top10F' electrocompetentes en 5 mL de medio líquido (LB) bajo en sal a pH 7.5, a 37 °C, a 180 rpm por 16 h. Del preparado, se recolectó 2 mL para diluirlo en 40 mL de medio LB bajo en sal (pH 7.5), en las mismas condiciones anteriores. Luego, el medio fue centrifugado a 2450xg por 7 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 35 mL de CaCl₂ 0.1 M, estéril en frío y se dejó reposando en hielo por 20 min. Esta solución nuevamente se centrifugó a 2450xg por 7 min. Se descartó nuevamente el sobrenadante y las células se resuspendieron en 8 mL de CaCl₂ a 0.1 M. A un volumen de esta resuspensión celular se adicionó 2 mL de glicerol al 50 % y fue almacenado a -80 °C (ThermoScientific) y el volumen restante fue utilizada para la etapa de transformación.

4.2.10.3. Transformación de Top10F' por choque térmico.

- Para la transformación se ensayó con 50, 100, 150 y 200 μL de Top10F' competentes combinados con 10 μL de pPICZ α A-rPLA₂a.
- La mezcla se incubó a 43 °C por 1 min y 30 s, seguidos por 3 min y 10 s en hielo (*Heat Shock*).
- Luego, se adicionaron 900 μL de medio LB bajo en sal a pH 7.5, la cual fue incubado a 37 °C por 1 h.
- Posteriormente, la suspensión celular fue agregada a placas con medio agar LB bajo en sal pH 7.5 conteniendo 30 $\mu\text{g/ mL}$ del antibiótico Zeocina™.
- Las placas contenían 100, 150 y 200 μL de bacterias transformadas y se dejaron incubando a 37 °C por 16 h.

El esquema y eventos durante el clonamiento se detallan en la figura 14.

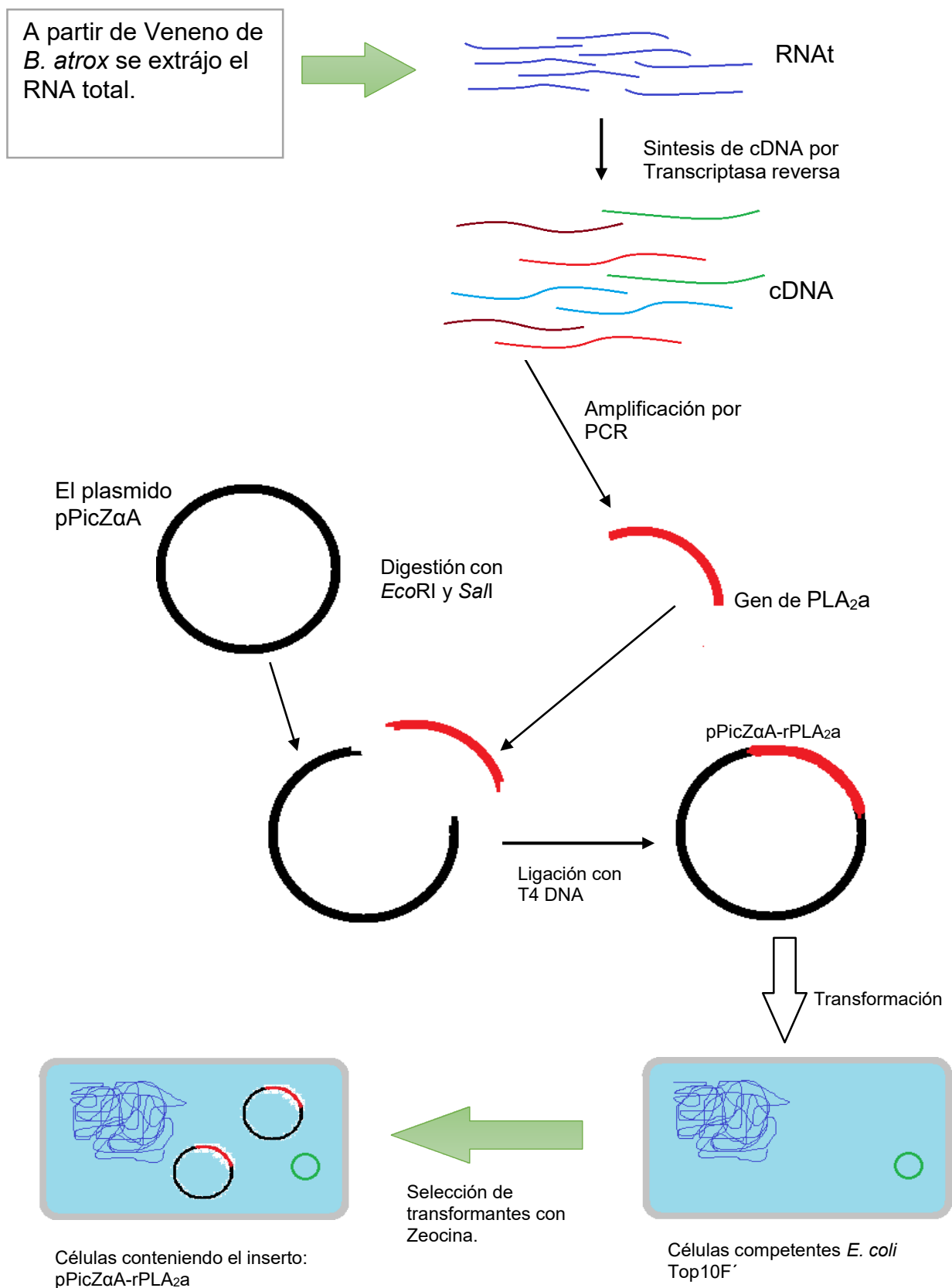


Figura 14. Esquema de clonamiento de la PLA₂ ácida (PLA_{2a}) de *B. atrox* en el sistema bacteriano *E. coli*, Cepa Top10F'.

4.2.10.4. PCR de colonias transformantes de la cepa Top10F'

Para confirmar la presencia del inserto en el plásmido se procedió a una PCR de colonia usando los cebadores 3'-AOX1 la cual es altamente específico al vector y F1-EDBAaPLA2. Se recolectó una alícuota de cada colonia un volumen aproximado de 1 µL y se agregó directamente al tubo de reacción. Se detalla a continuación los reactivos empleados en la PCR en la tabla 14.

Tabla 14. Reactivos y concentraciones en la PCR de colonia.

Reactivos	[] inicial	Volúmen (µL)	[] final
H ₂ O _(mQ)	--	5.8	--
Tampón Phusion (MgCl ₂)	5 X	2	1 X
dNTPs	10 mM	0.2	0.2 mM
F1-EDBAaPLA2	10 µM	0.4	0.4 µM
3'-AOX1	100 ng/ µL	0.2	20 ng
Colonia	--	1	--
Phusion™ High-Fidelity DNA polimerasa	2 U/ µL	0.4	0.8 U
Volúmen total		10 µL	

Las etapas, condiciones de temperatura, tiempo y ciclos se detallan en la tabla 15.

Tabla 15. Etapas y condiciones de temperatura durante la PCR.

Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	4 min	1
Desnaturalización	95	40 s	33
<i>Annealing</i>	59	30 s	
Extensión	72	30 s	
Extensión final	72	6 min	1
Mantenimiento	4	---	

Para la confirmación del inserto en el plásmido se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1 %, se diluyó 0.4 g de agarosa en 40 mL de tampón TAE 1 X y se sometió la electroforesis a 100 V por un tiempo de 50 min. Luego, se

mezcló 1 μ L de tampón de carga conteniendo GelRed (100 X) con 5 μ L del amplicón.

Por otro lado, la colonia conteniendo el inserto en el plásmido, fue cultivado en medio líquido LB bajo en sal pH 7.5 conteniendo el antibiótico Zeocina™ para aumentar la biomasa de dicha colonia y proceder a la purificación del plásmido con el inserto.

4.2.10.5. Purificación del plásmido recombinante pPicZ α A-rPLA_{2a}

Para la purificación del plásmido se procedió a seguir con el protocolo de centrifugación del kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen).

- Se centrifugó ~ 30 mL de medio líquido LB bajo en sal con la biomasa de células, previamente incrementada, a 3.800xg por 5 min.
- Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió con 250 μ L de tampón R3.
- Luego, se agregó 250 μ L del tampón de lisis (L7) y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 min.
- De inmediato, se agregó 350 μ L de tampón de precipitación (N4). La mezcla se homogenizó por inmersión y el lisado se centrifuga a 12.000xg por 10 min.
- Luego, el sobrenadante del paso anterior fue recolectado y agregado en la columna de spin contenido en un tubo de 2 mL. Se centrifugó a 12.000xg por 1 min y se descartó el flujo y la columna se retornó al tubo de lavado.
- Se agregó 700 μ L de tampón de lavado (W9) y se centrifugó la columna a 12,000xg por 1min. Se descartó el flujo y se volvió a colocar la columna al tubo de lavado y se volvió a centrifugar a 12,000xg por 1 min para retirar residuos del tampón de lavado.
- Finalmente, se colocó la columna de spin en un nuevo tubo estéril de 1.5 mL y se agregó 75 μ L de tampón TE (pre calentado) en el centro de la columna.
- Se centrifugó la columna a 12,000xg por 2 min y se guardó el tubo de 1.5 mL a -20 °C para su posterior empleo.

4.2.11. Expresión de rPLA_{2a} en *Pichia pastoris*

4.2.11.1. Linealización del pPicZαA-rPLA_{2a} con la enzima de restricción *PmeI* (New England BioLab Inc.)

El plásmido con el inserte (pPicZαA-rPLA_{2a}) fue linealizado con la enzima de restricción *PmeI* e incubado a 37 °C por 1 h, mientras que su inactivación fue a 65 °C por 20 min. A continuación, se muestra en detalle los componentes de la reacción, ver tabla 16.

Tabla 16. Reactivos y concentraciones en la linealización del plásmido recombinante.

Reactivos	[] inicial	Volúmen (μL)	[] final
H ₂ O _(mQ)	-	12	--
Tampón <i>Cut Smart</i>	10 X	6	1 X
pPicZαA-rPLA _{2a}	69.5 ng/ μL	40	2.78 μg
<i>PmeI</i>	10 U/ μL	2	20 U
Volúmen total		60 μL	

Luego, el plásmido recombinante linealizado fue precipitado usando 10 μL de acetato de sodio 3.0 M pH 5.5 con 250 μL de etanol al 100 % en frío. Posteriormente se centrifugó a 14,000xg por 10 min y se dejó incubando a -80 °C por 20 min. Adicionalmente, se agregó 250 μL de etanol (80 %) en frío y se centrifugó a 14,000xg por 10 min. Finalmente, se descartó el sobrenadante y se agrega al pellet 10 μL de H₂O_{mQ}. El plásmido se cuantificó usando el NanoDrop Lite para su posterior almacenamiento a -20 °C hasta su uso.

4.2.11.2. Preparación de células competentes de *P. pastoris* (GS115/KM71H)

Se procedió de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante del kit EasySelect™ *Pichia* Expression (Invitrogen) y se explica a continuación (figura 15).

- Se dejó crecer a *Pichia pastoris*, la cepa GS115/KM71H, en 10 mL de medio líquido YPD en un tubo falcón de 50 mL a 30 °C por 16 h (toda la noche).

- Luego, se recolectó 200 μL del cultivo anterior y se inoculó a un nuevo medio líquido YPD de 150 mL, en un matraz de 2 L. El tiempo de incubación fue de 16 h (toda la noche), a 30 °C a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica $\text{OD}_{600} = 1.31$.
- Las células se centrifugaron a 1,500xg por 5 min a 4 °C. Se resuspendió el pellet en 40 mL de agua frío estéril.
- Posteriormente, las células se centrifugaron como en el paso anterior. Luego, se resuspendió el pellet con 40 mL de agua estéril en frío.
- Se centrifugó las células como en el paso anterior y se resuspendió el pellet en 6 mL de sorbitol 1.0 M en frío.
- Nuevamente, se centrifugó las células como en el paso anterior y se resuspendió el pellet en sorbitol 1.0 M en frío. Las células se mantuvieron en hielo hasta su uso.

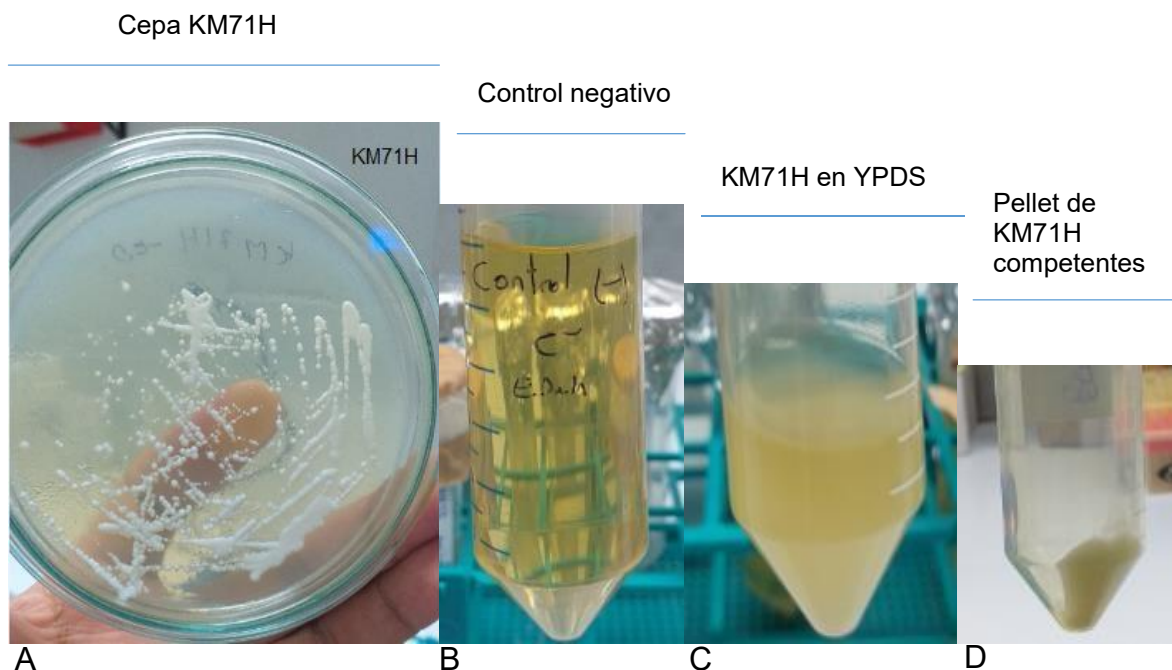


Figura 15. Esquema de preparación de células competentes de KM71H. A) Crecimiento de la cepa KM71H en medio YPD. B) Control negativo en el cual no hay contaminantes. C) Crecimiento a una densidad óptica (D.O 600 nm) de 1.3 y uno de los pasos previos para su activación a células competentes agregando sorbitol 1.0 M y en D) Pellet de las células competentes antes de la transformación.

4.2.11.3. Transformación de GS115 / KM71H por electroporación

Se procedió de acuerdo al protocolo descrito por Cregg y Russell, (1998) y MicroPulser™ Electroporation (Bio-Rad)

- Se homogenizaron 90 µL de células competentes (GS115 / KM71H) con 9 µL de pPicZαA-PLA₂ linealizado y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0.2 cm en frío.
- La cubeta con la mezcla se incubó por 5 min en frío.
- Las condiciones fueron de 1.5 kV y un tiempo de 4 ms.
- De inmediato se agregó 1 mL de sorbitol 1.0 M en frío a la cubeta y la mezcla se transfirió a un tubo falcón de 50 mL y se incubó a 30 °C por 2 h.
- Luego, se inoculó 50, 100 y 200 µL de la mezcla a placas que contenían medio agar YPDS + Zeocina (100 µg/mL).
- Posteriormente, las placas se dejaron incubando a 30 °C entre 5 a 10 días. Dichas placas fueron monitoreadas cada 3 días para verificar el crecimiento de las células transformantes.

V. RESULTADOS

5.1. PURIFICACIÓN DE LA BaPer-PLA_{2a}

La enzima purificada denominada BaPer-PLA_{2a}, es la primera isoforma ácida en ser aislada del veneno de la especie *Bothrops atrox* en Perú. Para ello, en la primera etapa de purificación se utilizó una columna de intercambio aniónico DEAE-Sephadex-A50 y se aplicó 120 mg de veneno crudo. En el cromatograma bajo condiciones isocráticas se obtuvo el primer pico (P1), luego se agregó a la columna el tampón con NaCl 0.3 M y se obtuvieron tres picos adicionales (2,3 y 4) y cuando se adicionó el segundo tampón NaCl 0.6 M, se obtuvo el pico 5 (P5), ver figura 16A. La actividad enzimática de la proteína en estudio se encontró en la caída del pico 4 (P4), y su actividad se evidencia en la línea roja (figura 16A). Las fracciones con actividad enzimática fueron juntadas, homogenizadas ligeramente y concentradas y sometidas a una segunda etapa de purificación por exclusión molecular en Sephadex-G75, la cual nos permitió obtener cinco picos (1-5). La BaPer-PLA_{2a} fue registrada en la caída del pico 3 (P3) como lo muestra la figura 16B.

Como último paso de purificación, se empleó el sistema cromatográfico líquido automatizado de presión media (MPLC). Para ello, se empleó una columna de intercambio aniónico ENrichQ. En la elución isocrática se obtuvo el primer pico (1) mientras que, cuando se utilizó una gradiente de NaCl desde 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, hasta 1.0 M, para separar a los contaminantes residuales, se obtuvieron dos picos adicionales (2 y 3). La BaPer-PLA_{2a} se encontró en el pico 3 (3) (figura 16C). La actividad enzimática en los tres pasos de purificación se evidencia en la línea roja (figura 16ABC)

Por otro lado, se verificó que la enzima en estudio está en un estado homogéneo como lo evidencia el análisis por SDS-PAGE (figura 17). Finalmente se logró obtener la enzima con una purificación de 14.82 veces y un rendimiento de 3.39 %, como se muestra en la Tabla 17.

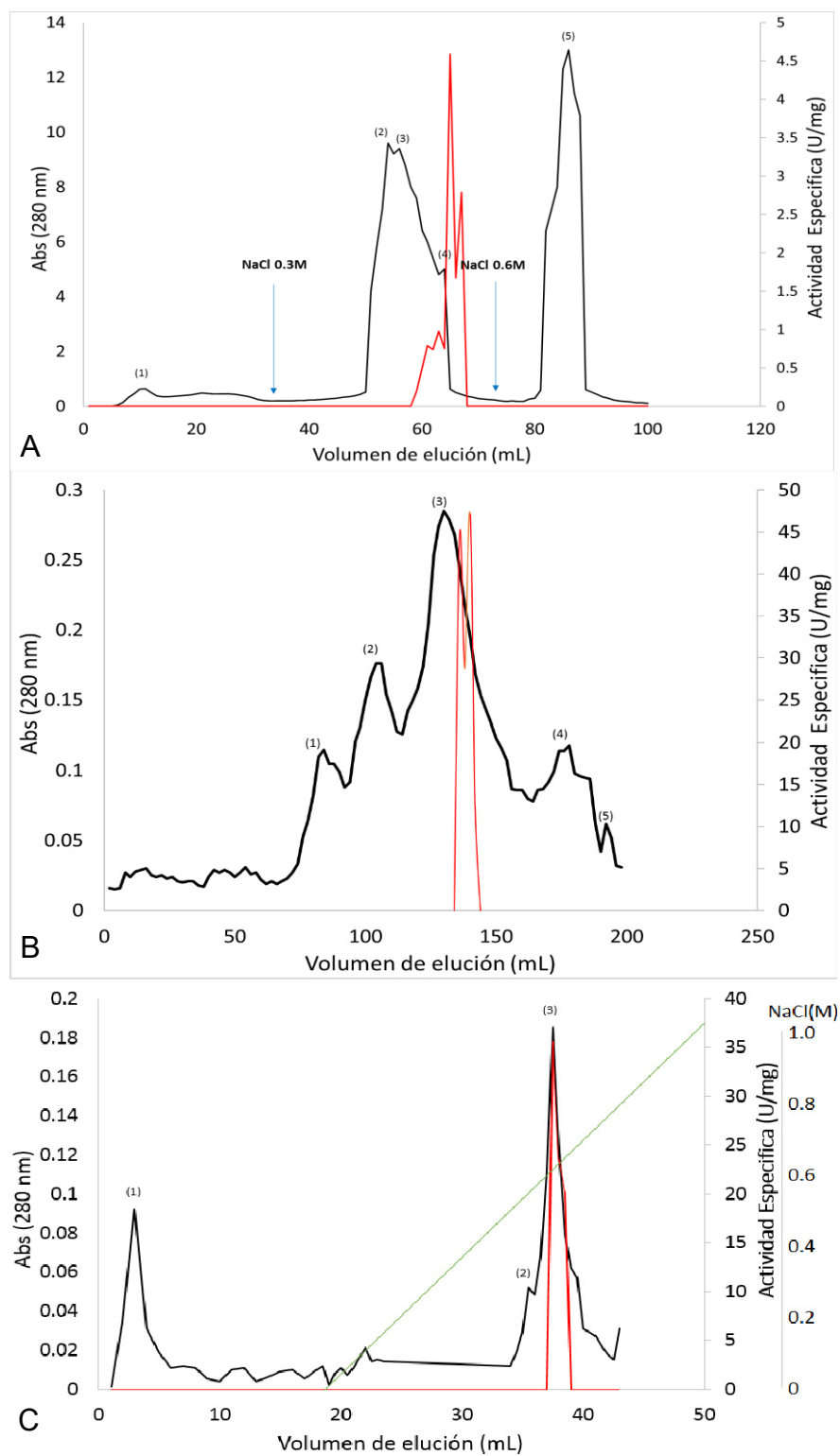


Figura 16. Cromatogramas de purificación. A) Primer paso de purificación en DEAE-Sephadex A-50, B) Segundo paso en Sephadex G-75 y C) Tercer paso en un intercambio aniónico EnrichQ. La línea roja en todas las etapas indica la actividad enzimática de BaPer-PLA_{2a}. En C) la línea verde indica la gradiente de NaCl (0.1 - 1.0 M).

Tabla 17. Recuperación y rendimiento de la purificación de BaPer-PLA_{2a}.

Etapas	Proteína Total		A.E. (U/mg)	U.T.A.	Rendimiento %	Purificación
	mg	%				
Inicial: Veneno Crudo	120	100	2.3	276	100	1
1° : DEAE-Sephadex A50	52.98	44.15	7.14	378.27	137	3.1
2° : Sephadex G75	3.709	3.09	16.34	60.6	21.96	7.1
3° : ENrichQ	0.275	0.229	34.1	9.377	3.39	14.82

A.E.: Actividad Específica (U/mg de proteína), determinado por el método yema de huevo

U.T.A: Unidades Totales de Actividad.

5.2. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR POR SDS- PAGE

Se realizó un SDS-PAGE al 15 % de acrilamida en condiciones no reductoras y reductoras. Se utilizó ~30 µg de veneno crudo (VC), ~10 µg de la enzima parcialmente purificada (P2) y ~10 µg de la enzima purificada (P3). Se evidenció que la BaPer-PLA_{2a} tiene un peso molecular de ~14.8 kDa en condiciones no reductoras (figura 17).

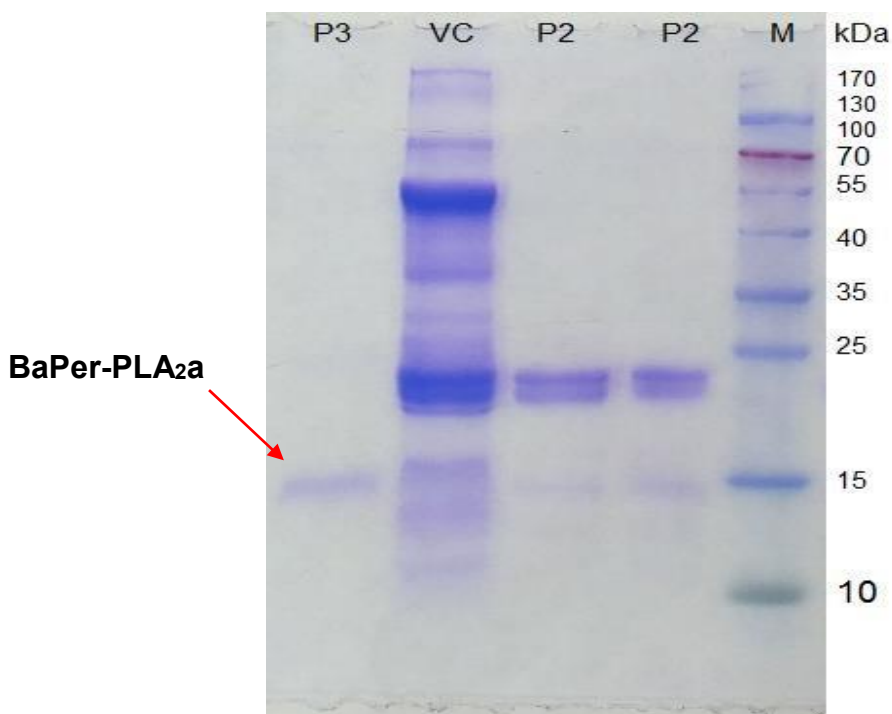


Figura 17. El SDS-PAGE en condiciones no reductoras. La flecha roja indica a la enzima en estudio purificada (P3), veneno crudo (VC), la enzima parcialmente pura (P2) y el marcador (M) de peso molecular de 10-170 kDa.

5.3. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

La medición de la actividad enzimática se realizó usando la prolongación del tiempo de coagulación de la emulsión de yema (Vidal y Stoppani, 1971). Se obtuvo una actividad específica de 34.1 U/mg de la enzima purificada en su estado homogéneo lo que equivale a una purificación de 14.82 veces comparado con el veneno total (tabla 17). Adicionalmente, se realizó la medición de actividad enzimática usando el sustrato fosfatidilcolina. En la fracción 1 (F1) se usó 0.37 μg obteniendo una actividad enzimática específica de 178 U/mg, mientras que el veneno crudo (VC) se obtuvo un valor de 3.25 U/mg (figura 18).

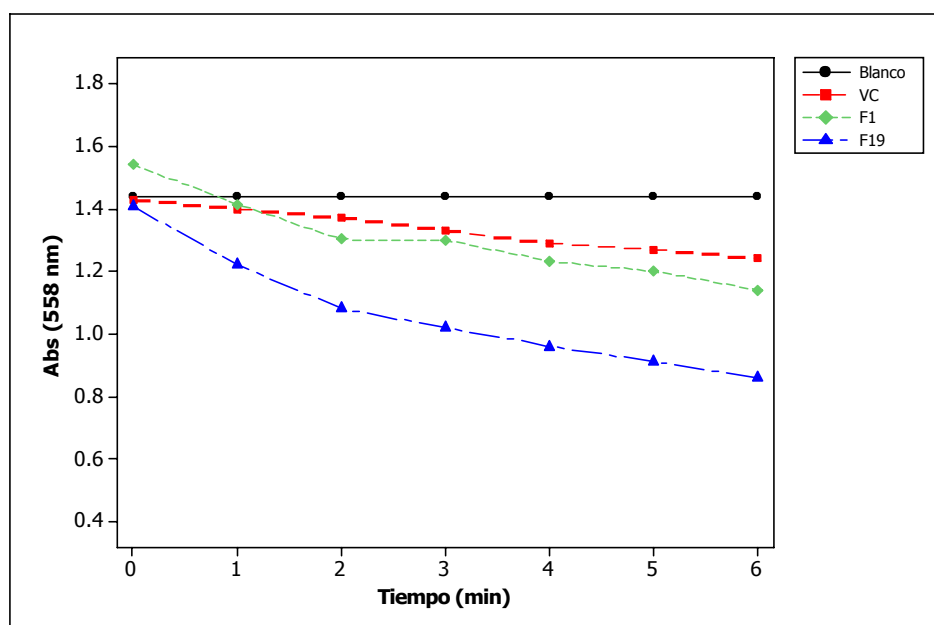


Figura 18. La actividad enzimática de BaPer-PLA_{2a} teniendo como sustrato a fosfatidilcolina. Los símbolos (triángulo, cuadrado, rombo) muestran el descenso en la absorción debido a la liberación de ácidos grasos que acidifican y cambian el color del medio. El triángulo azul muestra la fracción 19 usando 2.5 μg de proteína (F19), en tanto que en el rombo verde es la fracción 1 usando 0.37 μg (F1), el cuadrado rojo es el veneno crudo usando 10 μg (VC) y el círculo negro es el blanco.

5.4. ACTIVIDAD MIOTÓXICA

La enzima BaPer-PLA_{2a} carece de actividad miotóxica al obtener valores iguales o menores al blanco durante el ensayo de actividad de creatina quinasa (CK). Asimismo, la isoforma de PLA₂ básica miotóxica alcanzó un valor de 740 U/L de liberación de creatina quinasa. Sin embargo, cuando la BaPer-PLA_{2a} fue combinado con la isoforma básica, su valor aumentó a 915 U/L, lo que equivale a un incremento del 21.58 % de la actividad miotóxica de la isoforma de PLA₂ básica miotóxica (figura 19).

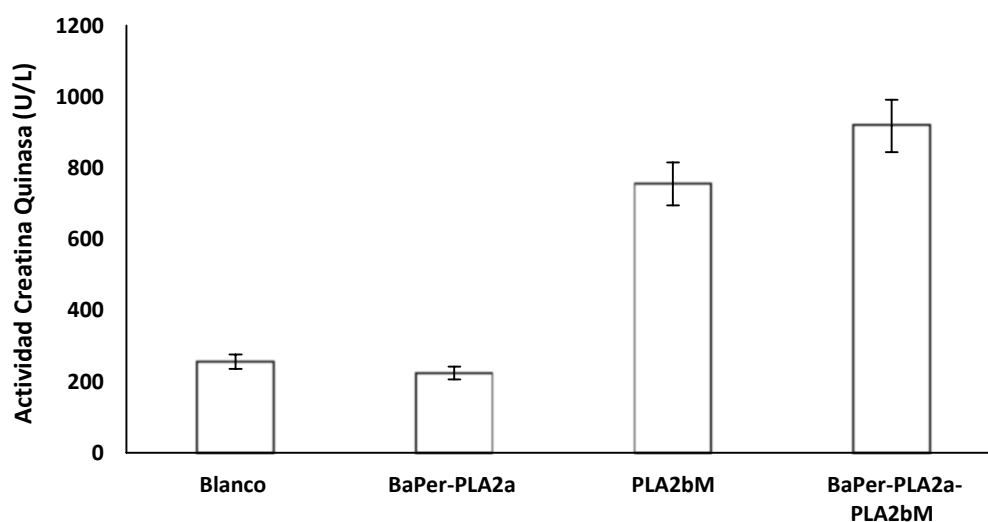


Figura 19. La actividad creatina quinasa (CK). La barra de color verde se muestra a la PLA₂ básica miotóxica (20 µg), la barra amarilla es la BaPer-PLA_{2a} (30 µg) y la combinación de ambas isoformas PLA₂ básica y BaPer-PLA_{2a} en la barra celeste (20 µg + 5 µg), respectivamente. La barra negra es el blanco, la cual se inyectó 100 µL (NaCl 0.9 %).

5.5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

En la caracterización molecular se inició con 40 mg de veneno liofilizado y también se ensayó a partir de 65 mg de veneno de tejido glandular. Los resultados de RNA total y síntesis a cDNA se muestran en la tabla 18. Por otra parte, en la amplificación

del gen de BaPer-PLA_{2a} se obtuvo un producto de ~480 pb la cual fue confirmado mediante electroforesis como se observa en la figura 20.

Tabla 18. Cuantificación del RNA total y cDNA.

Veneno	Cuantificación	
	RNA total (ng/μL)	cDNA (ng/μL)
Veneno liofilizado	77	541
Veneno de tejido glandular	1282	762

(*) En la síntesis de cDNA se uso una cantidad similar de ng/ μL de RNA total.

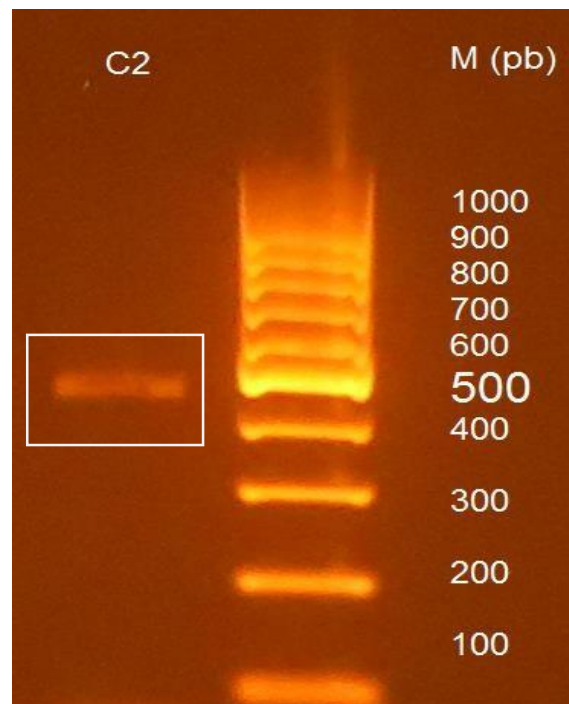


Figura 20. Amplificación de la BaPer-PLA_{2a} nativa por PCR. Se muestra la electroforesis en agarosa (1 %). En C2 se muestra la banda del amplificado en cuadro blanco con un peso molecular de ~ 480 pb y el marcador (M) de peso molecular entre 100-1000 pb.

5.6. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

5.6.1. Análisis del gen de la BaPer-PLA_{2a}

Se obtuvo el marco de lectura abierta (*Open Reading Frame*; ORF) del gen de la BaPer-PLA_{2a} usando el programa *ORF finder* de la plataforma de NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>. El ORF1+1 indica 118 residuos de aminoácidos que constituyen a la enzima en estudio y una longitud del gen de 357 pb, la cual inicia considerando un ATG (metionina) en la posición 19. La identificación de la secuencia fue sin tomar en cuenta la región del péptido señal la cual contiene el codón ATG (metionina) de inicio, por ello el ORF1 tiene una menor longitud (figura 21).

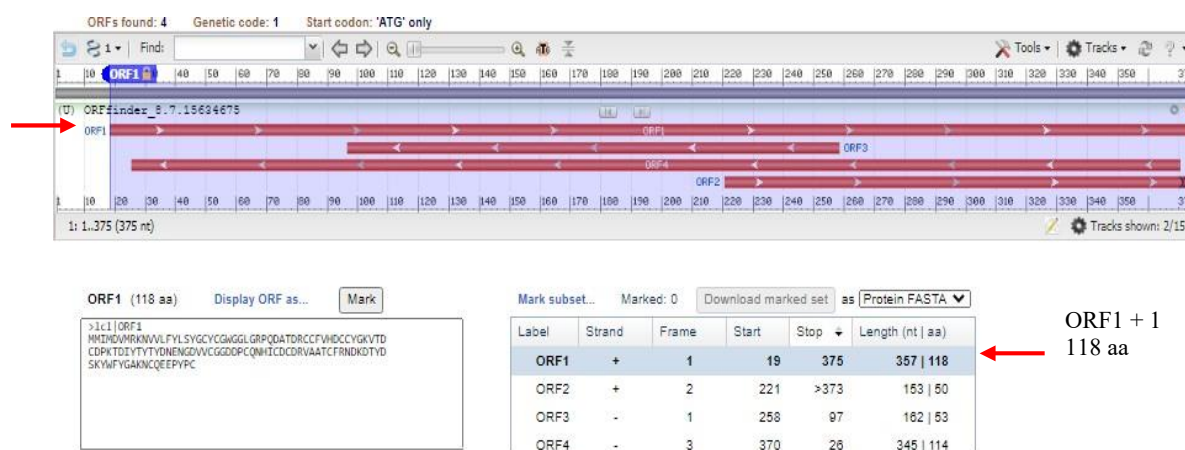


Figura 21. Marco de lectura abierta (ORF) de las secuencias nucleotídicas de BaPer-PLA_{2a}. La flecha en rojo indica el ORF1, la cual comprende el gen de la enzima en estudio y fue desarrollado usando el programa *ORF finder* (Fuente: NCBI).

5.6.2. Análisis de la secuencia BaPer-PLA_{2a}

El secuenciamiento del cDNA evidenció una longitud de 372 pb, del cual se dedujo la estructura primaria de la proteína madura de 124 residuos de aminoácidos, sin considerar el péptido señal, para la cual fue usado el programa *Translate tool* de la plataforma ExPASy <https://web.expasy.org/translate/>. En la figura 22, se muestra la

correspondencia de cada triple de nucleótido hacia cada residuo de aminoácido. La línea azul indica la región N-terminal y el cuadro en rojo muestra los dos residuos de aminoácidos altamente conservados, la histidina y el ácido aspártico en las posiciones 48 y 49, respectivamente (figura 22).

```

AGCCTGGTGGCATTGAGATGATGATTATGGATGTGATGAGGAAAAACGTTGTTTGTTC
S  L  V  A  F  E  M  M  I  M  D  V  M  R  K  N  V  V  L  F

TACCTCTCTTACGGATGCTACTGCGGCTGGGGGGGCCTAGGCCGGCCACAGGACGCCACT
Y  L  S  Y  G  C  Y  C  G  W  G  G  L  G  R  P  Q  D  A  T

GACCGCTGCTGCTTTGTGCACGACTGCTGTTATGGAAAAGTGACCGACTGCGACCCAAAA
D  R  C  C  F  V  H  D  C  C  Y  G  K  V  T  D  C  D  P  K

ACGGACATCTACACCTACACCTACGACAACGAGAACGGGGATGTCGTCTGCGGAGGGGAC
T  D  I  Y  T  Y  T  Y  D  N  E  N  G  D  V  V  C  G  G  D

GACCCGTGCCAGAATCATATTTGTGACTGCGACAGGGTTGCCGCAACCTGCTTCCGAAAC
D  P  C  Q  N  H  I  C  D  C  D  R  V  A  A  T  C  F  R  N

GATAAGGACACATACGACAGTAAATATTGGTTTTACGGGGCCAAAAATTGCCAGGAGGAA
D  K  D  T  Y  D  S  K  Y  W  F  Y  G  A  K  N  C  Q  E  E

CCATACCCATGCTAA
P  Y  P  C  *

```

Figura 22. La secuencia completa del cDNA y su traducción a la estructura primaria de aminoácidos. La línea azul es la región N-terminal, el cuadro rojo los residuos His48 y Asp49 y el asterisco indica el codón de terminación (TAA).

5.6.3. Alineamiento múltiple de la BaPer-PLA_{2a}

El análisis del alineamiento múltiple de BaPer-PLA_{2a} usando el programa BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), demostró una alta homología de la estructura primaria deducida a partir de su cDNA, con otras PLA₂ ácidas del género

Bothrops sp. y *Trimeresurus* sp. Posteriormente, se desarrolló el alineamiento múltiple con un total de 15 PLA₂ ácidas usando el programa MEGAX <https://www.megasoftware.net/>, obteniendo los más alto porcentaje de identidad a nivel de la estructura primaria de aminoácidos con las PLA₂ ácidas del veneno de *Bothrops asper* con el 83 % (número de accesoión: ATP66581) y 81.4 % (número de accesoión: P86389). Seguido de un 78 % de identidad de secuencias de aminoácidos con *B. jararaca* (P81243), 77.4 % con *B. moojeni* (G3DT18), 75 % de identidad con la serpiente *B. jararacussu* (Q8AXY1), 75 % de *B. insularis* (Q8QG87), 75 % con *B. erythromelas* (Q2HZ28) y 75 % *B. diporus* (AFJ79207). Adicionalmente, se obtuvieron otros porcentajes menores de 73 % con *B. jararacussu* (1UMV-X), 74 % con *B. pirajai* (C9DPL5), 73.3 % con *B. diporus* (AFJ79208), 69.1 % *Trimeresurus gramineus* (P20476), 68 % *T. stejnegeri* (Q6H3C9), 67.7 % *B. alternatus* (P86456) y 68.5 % *T. gramineus* (P81480).

El alineamiento múltiple de la BaPer-PLA_{2a} y las 15 PLA₂ ácidas presentó regiones altamente conservadas a nivel de su estructura primaria. Hay 14 residuos de cisteínas cuyo símbolo es (C), las cuales forman los 7 enlaces disulfuro (S-S), asimismo presentan 4 residuos de aminoácidos la tirosina (Y), glicina (G), glicina (G) y ácido aspártico (D), en las posiciones 28, 30, 32 y 49 respectivamente, las cuales formaran el loop de unión al ion Ca²⁺. La región del centro catalítico está constituida por los residuos histidina 48 (H48), ácido aspártico 99 (D49), tirosina 73 (Y73) y tirosina 52 (Y52). Además, se dedujo su punto isoeléctrico (pI) teórico de 4.41. Esto permitió concluir que se trata de una isoforma de PLA₂ ácida. Asimismo, durante el alineamiento múltiple los residuos se enumeraron de acuerdo a lo descrito por Renetseder *et al.* (1985), por lo que se dejó un vacío en la posición 15 para poder enumerar correctamente y permitir ubicar en la posición 49 al ácido aspártico (Asp49), por lo cual concluir que la enzima en estudio pertenece la clase D49PLA₂ de las isoformas ácidas (figura 23).

5.6.4. Modelamiento estructural de la BaPer-PLA_{2a}

El modelamiento estructural teórico de la BaPer-PLA_{2a} fue modelado por homología de secuencia con la estructura cristalizada de la PLA₂ ácida cuya resolución fue de 1.9 Å denominada dBthA-I (monómero A) de *Bothrops Jararacussu* (PDB: 1U73.1A) (Magro *et al.*, 2004), la cual presenta un porcentaje de identidad del 76.23 % con la BaPer-PLA_{2a} empleando el programa SWISS-MODEL. La estructura modelada presenta tres las α-hélice principales (h1, h2 y h3) y un hélice corto. El α-hélice 1 corresponde a la región N-terminal, dos hojas-β antiparalelo (β-wing), un *loop* de unión al ion Ca²⁺ (Y28, G30, G32 y D49), un centro catalítico (H48, D99, Y73 y Y52) y una región C-terminal. En la estructura se muestra el residuo His48 que participa en el inicio de la actividad catalítica (figura 24).

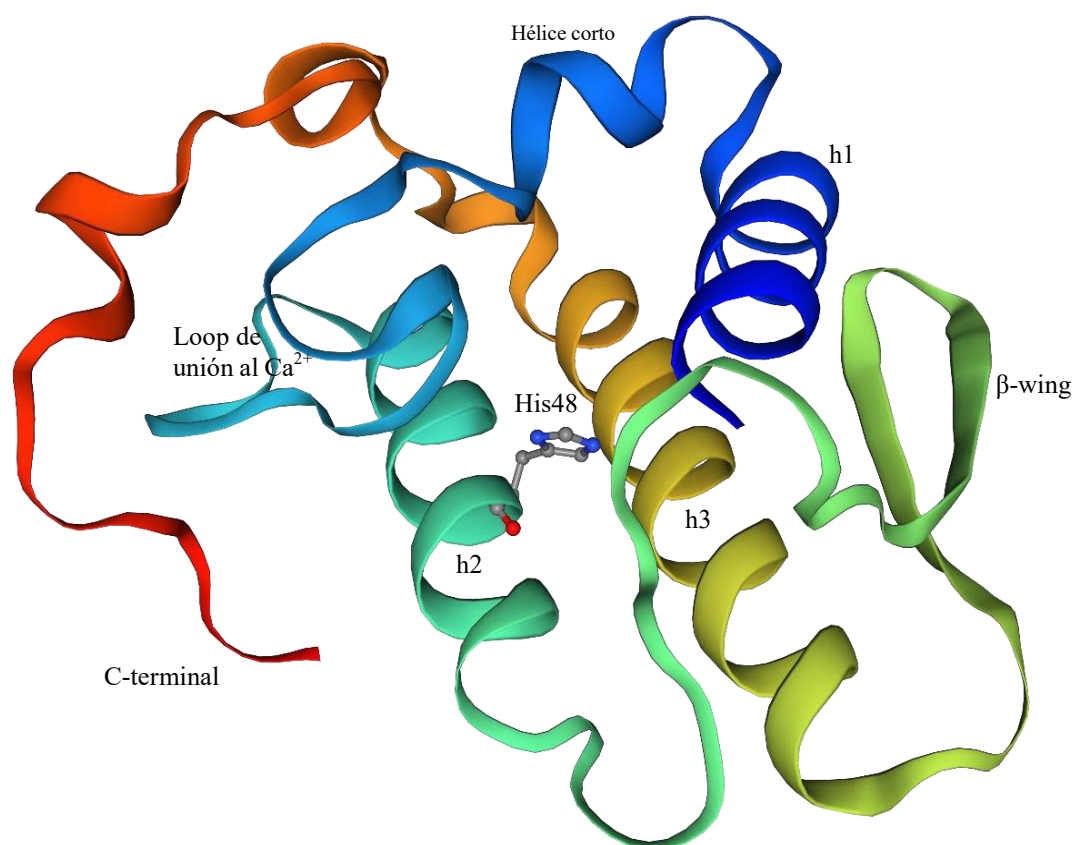


Figura 24. Modelo teórico estructural de la BaPer-PLA_{2a} desarrollado por SWISS-MODEL, modelo RIBBON (Carson, 1997). En celeste el loop de unión al calcio, en cian el centro catalítico (His48), en verde el lazo-β, las tres α-hélice (h1, h2, h3) y en rojo la región C-terminal.

Por otro lado, el diagrama de Ramachandran (Ramachandran *et al.*, 1963), permitió confirmar que el 95.9 % de los residuos de aminoácidos de la estructura tridimensional se encuentran dentro de la zona permitida, mientras que el 1.62 % en la zona no permitida y el 0.92 % presentan un ángulo diedro no permitido (figura 25).

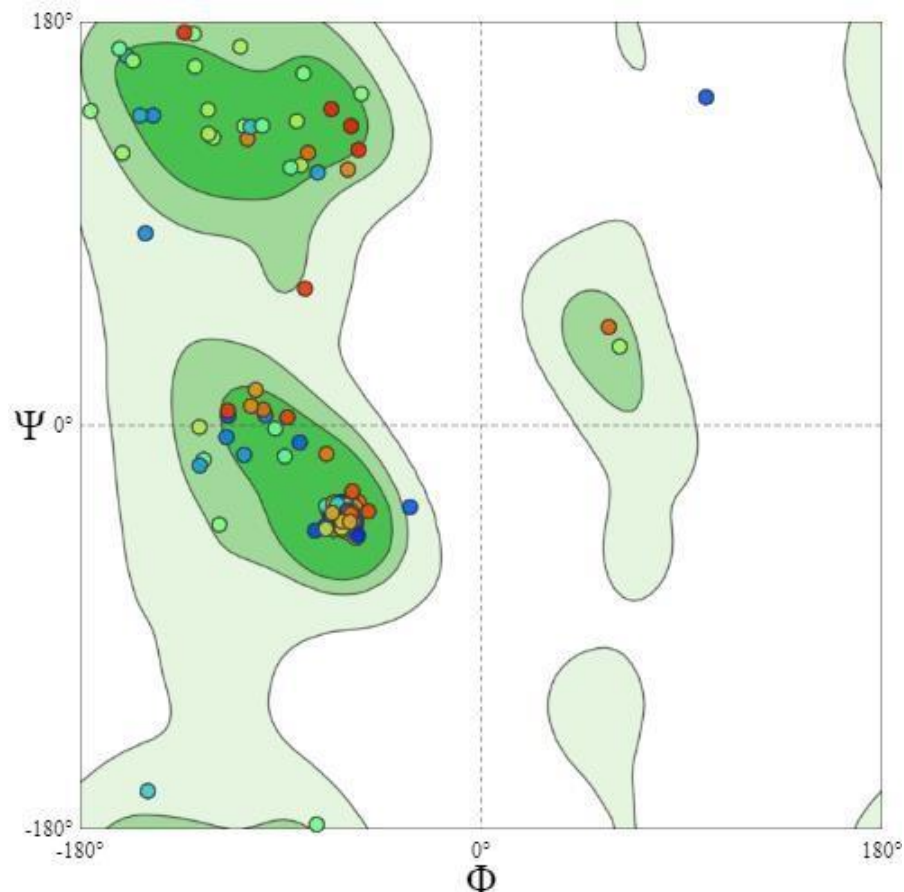


Figura 25. El diagrama de Ramachandran de BaPer-PLA_{2a}. La mayoría de los residuos de aminoácidos de la estructura teórica de BaPer-PLA_{2a} están en la zona permitida. El diagrama fue desarrollado por el programa *MolProbity* 4.4 (Chenn *et al.*, 2010) (SWISS-MODEL).

5.6.5. Análisis filogenético de la BaPer-PLA_{2a}

El árbol filogenético basado a nivel de la estructura primaria de la BaPer-PLA_{2a} y 14 fosfolipasas A₂ ácidas y 3 básicas, las cuales muestran claramente una separación y agrupación en dos clases. Las clases de D49PLA₂ ácidas y D49PLA₂

básicas. Las D49PLA₂ ácidas, a su vez formar pequeñas agrupaciones y en las cuales la enzima en estudio está cercanamente agrupado con las isoformas ácidas de Brasil (BpirPLA2-I, 1U73A, 1UMVX y BinTX-I), Colombia (ATP66581) y Costa Rica (BaspPLA2-II) (figura 26).

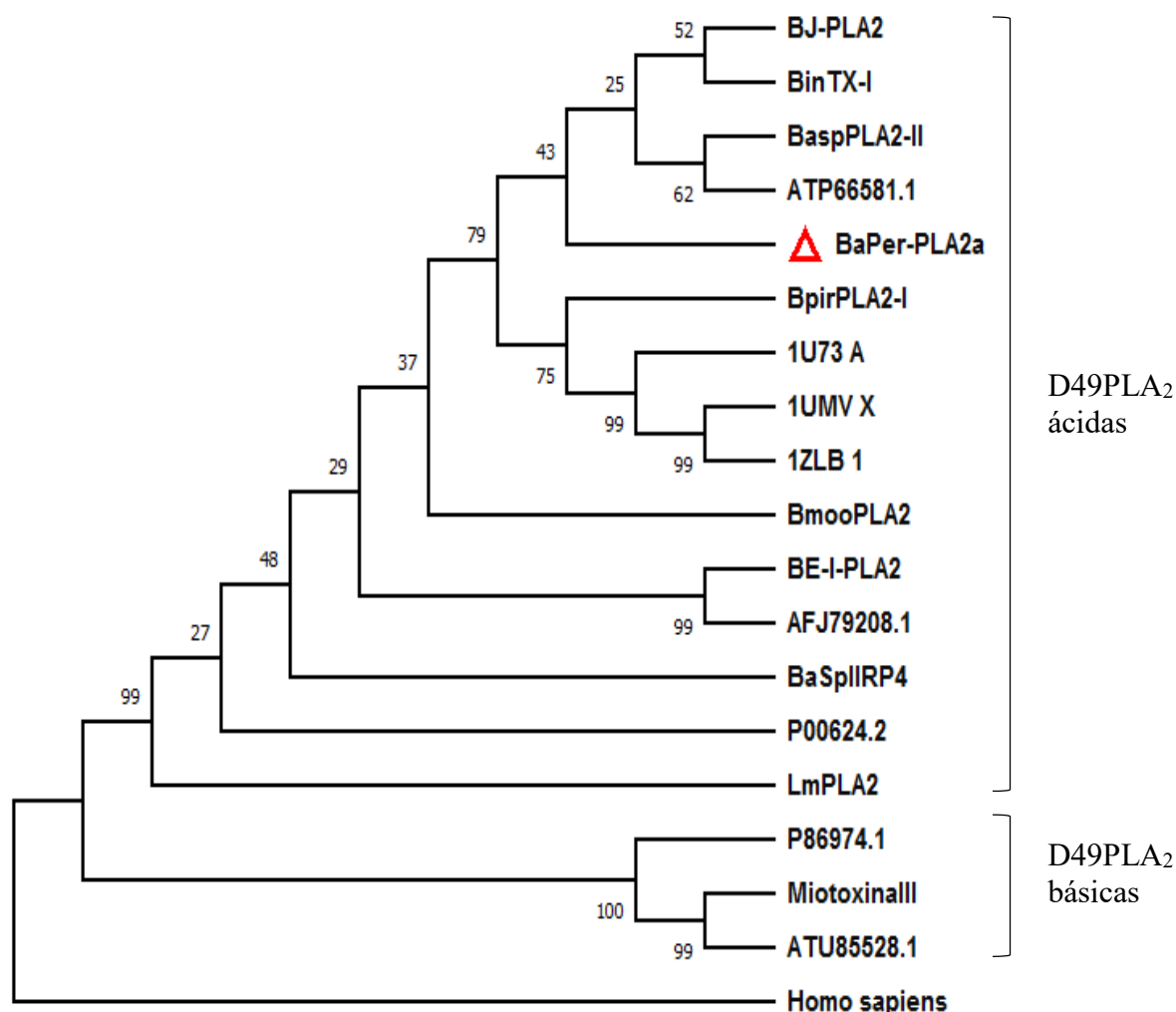


Figura 26. La historia evolucionaria de la BaPer-PLA₂a con otras fosfolipasas A₂. Se formaron dos grupos dentro de las D49PLA₂ (ácidas y básicas). Se incluye como grupo externo a la PLA₂ secretora del subgrupo IID del hombre. En triángulo rojo se muestra la proteína en estudio BaPer-PLA₂a de la serpiente *B. atrox*. La *Bothrops asper* (Accesión: ATP66581), *Bothrops jararacussu* (PDB: 1U73A, 1UMVX), *Bothrops jararacussu* (PDB:1ZLB1), *Bothrops insularis* (Q8QG87:BinTX-I), *Bothrops pirajai* (C9DPL5:BpirPLA2-I), *Bothrops moojeni* (BmooPLA₂), *Bothrops diporus* (Accesión:AFJ79208), *Bothrops jararaca* (P81243:BJ-PLA₂), *Bothrops asper* (P86389:BaspPLA₂-II), *Bothrops alternatus*

(BaSplIRP4), *Bothrops erythromelas* (BE-I-PLA₂), *Bothrops diporus* (AFJ7208), *Lachesis muta* peruana (LmPLA₂) y las fosfolipasas A₂ básicas en; *B. asper* (miotoxinall), *B. moojeni* (Accesión: ATU85528), *B. leucurus* (P86974) y como grupo externo a la fosfolipasas A₂ secretora del hombre (AAD51390). El árbol se desarrolló empleando programa MEGAX.

5.7. CLONAMIENTO DEL VECTOR DE EXPRESIÓN pPicZαA-rPLA_{2a} EN *E. coli*

5.7.1. Construcción del vector de expresión

El cDNA de la PLA₂ ácida fue amplificado y secuenciado. El amplicón y el plásmido pPicZαA fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *SaII* para la construcción del vector de expresión. En la figura 27, se muestra el alineamiento de la proteína rPLA₂ ácida y la enzima previamente caracterizada BaPer-PLA_{2a}, los cuales comparten residuos conservados, así como una estructura primaria de 124 residuos de aminoácidos.

BaPer-PLA _{2a}	1	SLVAFEMIMDMVRKNVLFYLSYGCYCGWGGLGRPQDATDRCCFVHDCCYGKVTDCDPK	60
rPLA _{2a}	1	SLVAFEM + ++ K V+L+Y SYGCYCG GG GRPQDATDRCCFVHDCCYGKVT CDPK	60
BaPer-PLA _{2a}	61	TDIYTYTYDNENGDVVCGGDDPCQNHICDCDRVAATCFRDDKDTYDSKYWFYGAKNQEE	120
rPLA _{2a}	61	+DIYTYTY+NEN VVCGGDDPC+NHICDCDRVAATCFR+DKDTY++KYWF G KNC EE	120
BaPer-PLA _{2a}	121	SEPC	124
		PC	
rPLA _{2a}	121	PYPC	124

Figura 27. Alineamiento simple de la rPLA₂ ácida y BaPer-PLA_{2a} nativa. Ambos comparten residuos conservados en la estructura primaria de las fosfolipasas A₂ ácidas.

5.7.2. Transformación de Top10F' por choque térmico

En la transformación en *E. coli*, cepa Top10F', fueron inoculados 200 µL de células transformantes en placas que contenían medio sólido de LB bajo en sal

conteniendo el antibiótico zeocina. Se observaron el crecimiento de nueve colonias transformantes, los cuales fueron enumeradas del 1 - 9. Algunas colonias estuvieron distantes y definidas, en tanto que otras crecieron ligeramente juntas (figura 28).

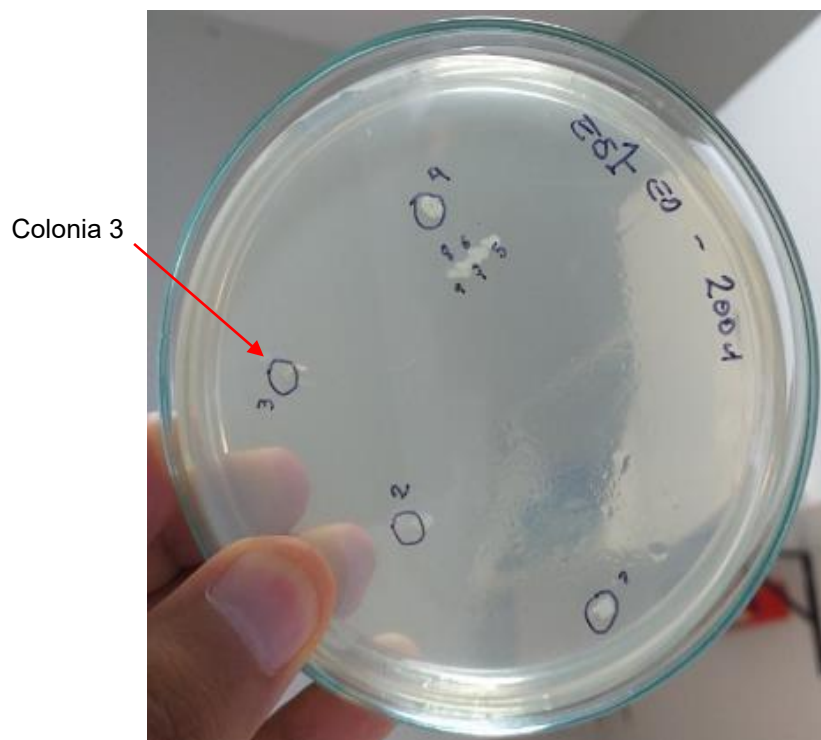


Figura 28. Transformación de *E. coli* cepa Top10F' en la placa con medio LB bajo en sal pH 7.5 con el antibiótico Zeocina (30 µg/mL), con el código ES1-ED. Las colonias fueron enumeradas en círculo oscuros (1 - 9) y se señala con flecha roja la colonia 3.

5.7.3. PCR de colonias transformantes de Top10F'

Para confirmar la presencia del inserto (rPLA_{2a}) en el vector de expresión pPicZαA, se procedió a realizar una PCR de colonia tomando los cebadores F1-EDBAaPLA2 y 3'AOX1. Se procedió a realizar las PCRs de siete colonias enumerados de C1 hasta C7. Resultando la confirmación del inserto en el vector de expresión en la colonia 3, obteniendo un amplificado de ~500 pares de bases (pb) por electroforesis horizontal 1 % (Figura 29). Este peso molecular es casi similar al identificado en BaPer-PLA_{2a}.

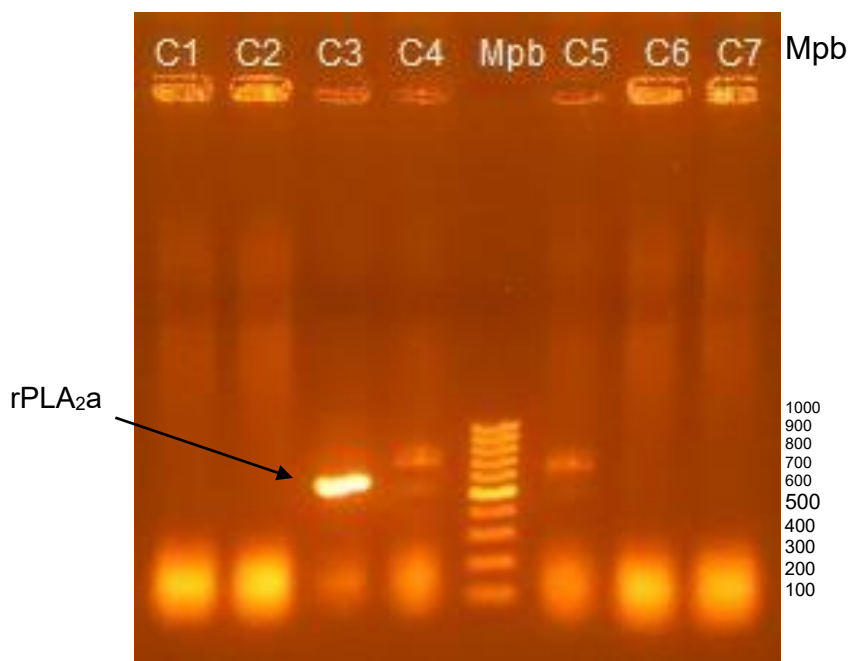


Figura 29. PCR de colonias transformantes de Top10F'. Las colonias están enumeradas de C1 a C7. La flecha negra muestra a la colonia C3 la cual presentó el inserto en el vector de expresión. Se observó que el amplificado tiene un peso molecular de ~500 pb. El marcador de peso molecular (M) de 100-1000 pb (ThermoScientific)

5.7.4. Purificación del plásmido recombinante

Una vez encontrada en la colonia 3 el inserto en el vector de expresión, pPicZαA-rPLA_{2a}, se procedió a purificar el plásmido recombinante obteniendo el valor de 69.5 ng/μL y una calidad de 1.7 (tabla 19). La electroforesis de 1 % evidencia el plásmido purificado y la diferencia de los pesos moleculares de P1, la cual tiene el inserto, con respecto a P2 y P3, las cuales son controles negativos, es decir no tiene el inserto (figura 30).

Tabla 19. Cuantificación del plásmido recombinante.

Repetición	Cuantificación (ng/μL)	Relacion (260/280)
P1	69.5	1.7
P1'	73.5	1.69

(*) P1 y P1': son repeticiones de plásmido recombinante.

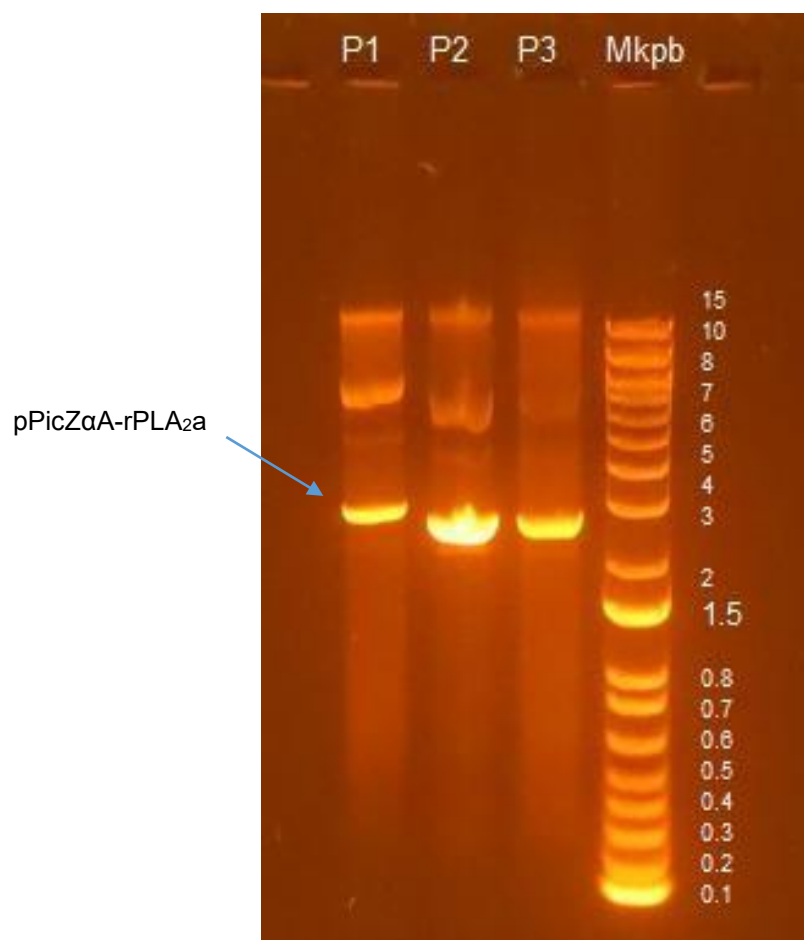


Figura 30. Purificación del plásmido recombinante. Se muestra la electroforesis en agarosa al 1 %. En P1 se ubica el plásmido recombinante purificado como lo indica la flecha azul, en tanto que P2 y P3 son controles negativos, plásmidos sin el inserto. El marcador (M) de alto peso molecular de 1 kpb (ThermoScientific).

5.8. EXPRESIÓN DEL VECTOR pPicZαA-rPLA_{2a} EN *P. pastoris*

5.8.1. Linealización del vector pPicZαA-rPLA_{2a} con la enzima de restricción *PmeI*.

Para la linealización del plásmido recombinante éste fue realizado por la enzima de restricción *PmeI*. Los plásmidos linealizados L1 y L2 tienen un peso superior a los plásmidos sin el inserto como lo indica la flecha en negro, mientras que L3, L4, L5 y L6 son los plásmidos linealizado sin el inserto (figura 31).

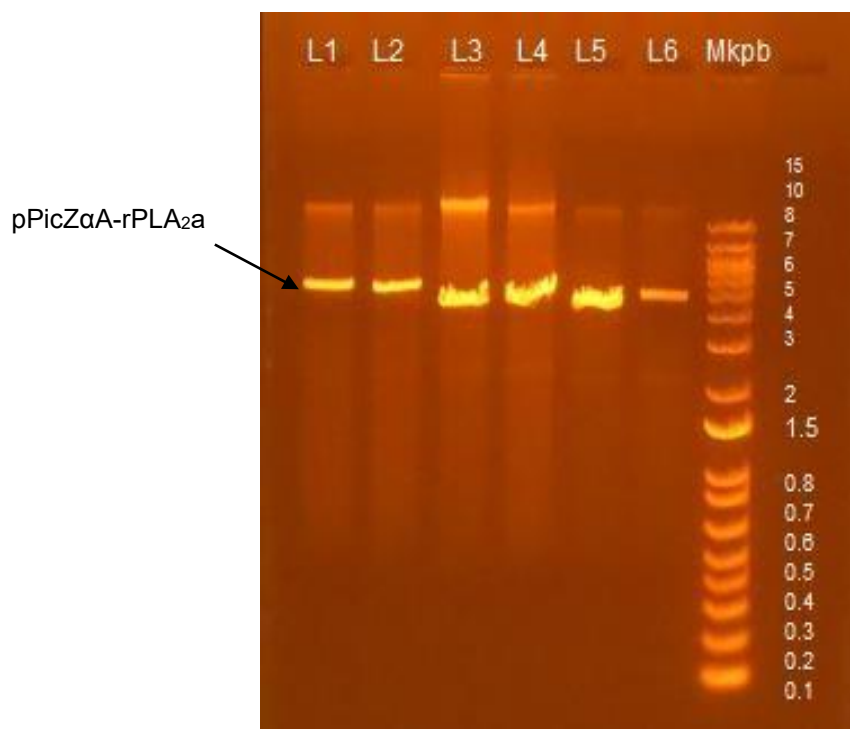


Figura 31. Linealización del plásmido recombinante. Electroforesis en agarosa al 1%. Los linealizados L1 y L2, corresponden a los plásmidos recombinantes, mientras que L3, L4, L5 y L6, los cuales son controles negativos (plásmido sin el inserto). La flecha indica la diferencia de pesos moleculares del plásmido recombinante linealizado con respecto a los controles. El marcador (M) de alto peso molecular de 1.0 kpb.

5.8.2. Transformación de la cepa GS115 por electroporación

En la transformación de *P. pastoris* cepa GS115 no fue favorable, probablemente debido a la poca cantidad de plásmido recombinante linealizado de 2.5 µg que se empleó para transformar a la cepa GS115 (figura 32). No obstante, se debe mencionar la consideración de otros parámetros para optimizar la transformación.

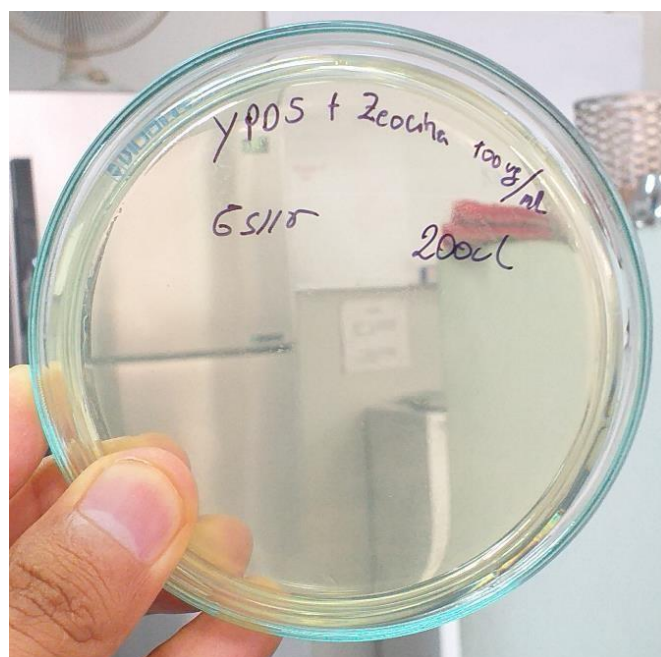


Figura 32. Transformación de GS115. Se inoculó 200 μ L de la cepa competente GS115 a una placa con medio agar YPDS+Z con el antibiótico Zeocina (100 μ g/mL). Evidenciado que no hubo transformación de la cepa.

VI. DISCUSIÓN

6.1. AISLAMIENTO DE LA BaPer-PLA_{2a} DE *B. atrox*

Los venenos de las serpientes presentan innumerables proteínas con o sin actividad enzimática, de alto o bajo peso molecular y con propiedades biológicas distintas, incluso pueden actuar sinérgicamente para potenciar dicho efecto biológico. Pueden actuar como monómeros, homodímeros o heterodímeros, en gran medida, debido sus variantes de isoformas localizadas en las glándulas venenosas de las serpientes, en la cual almacenan a las toxinas como arsenal biológico y liberados cuando son agredidos por su depredador o pretenda capturar una presa para inmovilizarla, digerirla y matarla.

Los efectos causados por mordeduras de serpientes, con especial atención en la especie *Bothrops atrox* del Perú, responsable de la mayoría de los casos de

envenenamiento, produciendo consecuencias irreversibles o conduciendo a la muerte de la víctima. Por tal motivo, para conocer el probable mecanismo de acción de la primera isoforma de fosfolipasa A₂ ácida; se le aisló y purificó mediante tres pasos cromatográficos, dos de los cuales son convencionales y un tercero, empleando un sistema cromatográfico líquido automatizado de presión media (MPLC); la enzima fue denominada BaPer-PLA_{2a} y procede de la especie más peligrosa y agresiva del país, la serpiente *Bothrops atrox* (Jergón de selva).

El aislamiento fue realizado inicialmente en cuatro pasos cromatográficos: intercambio catiónico usando la resina CM Sephadex C-50, exclusión molecular en la resina Sephadex G-75, seguido de un Sephadex G-50 y finalmente por intercambio aniónico sobre DEAE-Sephadex A-50, con un buffer de elución de acetato de amonio 50 mM pH 6.8, basado en gran medida en las metodologías descritas en trabajos previos (Pantigoso *et al.*, 2001;2002; Huatuco *et al.*, 2004; Mejía *et al.*, 2006; Inga *et al.*, 2010), desarrollados inicialmente en la purificación de miotoxinas básicas y fosfolipasas A₂ básicas. Otros recomiendan como primer paso, usar una resina de exclusión molecular para separar a las toxinas por peso molecular, seguido de una cromatografía de intercambio iónico para continuar con la separación por su carga (Kini, 2000; Ketelhut *et al.*, 2003; Resende *et al.*, 2017). Sin embargo, hay numerosos trabajos de purificación de fosfolipasas A₂ ácidas que han iniciado con la cromatografía de intercambio iónico, seguido de exclusión molecular y HPLC en fase reversa (Andriao-Escarso *et al.*, 2002; Rodrigues *et al.*, 2007; Santos-Filho *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011; Silveira *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2013). Con los cuatro pasos cromatográficos empleados, se consiguió purificar a la isoforma de PLA₂ ácida al estado homogéneo. No obstante, esto resultó en un proceso tedioso, con extensión de tiempo de purificación y con escasa recuperación de la enzima. Por ello, se desarrolló la metodología presentada en este trabajo.

El primer paso de purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico usando la resina DEAE Sephadex -A50, a partir de 120 mg de veneno total dio lugar a una recuperación de 52.98 mg de proteína, es decir casi la mitad del veneno, un factor de purificación de 3,1 y lo que es más notable un rendimiento de 137 % (tabla 17). Esto último señala la probable eliminación de un inhibidor acoplado a la

enzima. La BaPer-PLA_{2a} se ubica en todo el pico cuatro presentando una mayor actividad enzimática en la caída de P4 (figura 16A). Este resultado en un primer paso de purificación usando un intercambio iónico es similar a otros trabajos donde iniciaron con 170 mg y recuperaron 60 mg (Barbosa *et al.*, 2013) y en otro caso usaron 300 mg y recuperaron 139 mg (Rodrigues *et al.*, 2007). Por otra parte, en la segunda etapa de purificación se utilizó una columna de exclusión molecular usando la resina Sephadex -G75, equilibrado con el mismo tampón de elución para separar a los contaminantes de acuerdo al peso molecular y se obtuvo 3.7 mg de la enzima en estudio, una purificación de 7 veces y un rendimiento del 21.9 % (tabla 17). Note sé que la enzima aparece en la caída del tercer pico en esta corrida cromatográfica (figura 16B). Este segundo paso también fue considerado en el aislamiento de una PLA₂ ácida del veneno de la serpiente *Bothrops moojeni* (Santos-Filho *et al.*, 2008). El hecho de emplear una resina cargado positivamente en su superficie permitió retener a la BaPer-PLA_{2a} la cual tiene mayormente carga negativa y separar a otras toxinas con cargas positivas. Así mismo, la PLA₂ ácida presenta una carga negativa en su superficie lo cual ha sido reportado (Teixeira *et al.*, 2011).

En el tercer paso de purificación se empleó un sistema cromatográfico líquido automatizado de presión media (MPLC) – NGC (figura 12), para purificar a la isoforma BaPer-PLA_{2a}. Para ello se empleó un equipo adquirido recientemente por el laboratorio cuyas ventajas son la velocidad de purificación (50-100 mL/min) en lugar de las cromatografías convencionales cuyas velocidades de separación no son mayores a 30 mL/h. Adicionalmente este sistema automático purifica en tiempo real y con un alto grado de resolución. Bajo estas condiciones la enzima fue obtenida al estado puro con un factor de purificación 14.8 veces y un rendimiento de 3.39 % (tabla 17). Cuando se usó el tampón de elución isocrático se obtuvo un pico, mientras que usando una elución en gradiente de NaCl se obtuvieron dos picos adicionales. La proteína en investigación BaPer-PLA₂ se encontró en el tercer pico (figura 16C), recuperando 0.275 mg de enzima purificada BaPer-PLA₂, una actividad enzimática específica de 34 U/mg, un rendimiento de 3.39 % y una purificación de 14.8 veces (Tabla 17). El hecho de obtener poca cantidad de la enzima purificada (0.275 mg) es probable al haber usado poca cantidad de muestra de veneno crudo (120 mg) o a que la isoforma ácida presente en el veneno de la

especie *B. atrox* se encuentra en poca cantidad con respecto a la isoforma básica, además de considerar su edad, sexo, alimentación, hábitat y distribución geográfica (Chippaux *et al.*, 1991; Mackessy, 2010). Se puede observar que con el veneno crudo inicial se tenía una actividad enzimática específica de 2.3 U/mg y después de estas tres etapas de purificación se obtiene a la BaPer-PLA_{2a} con una actividad enzimática específica de 34 U/mg, la cual confirma que esta pura por el hecho del aumento en 14 veces con respecto al valor inicial del veneno crudo y también se confirma mediante el SDS-PAGE. El equipo cromatográfico líquido de presión media (MPLC) de próxima generación (NGC)- Bio-Rad, fue usado en esta investigación y ofreció grandes ventajas, el mismo que también fue usado y estandarizado en la purificación de proteínas en otras especies, en la cual se usó una tasa de flujo de 8 mL/min y las fracciones fueron colectados en volúmenes de 0.5 hasta 1.0 mL (Baruah *et al.*, 2018), asimismo fue usado en la purificación de proteínas y proteínas recombinantes como el dominio Fc (Becker *et al.*, 2019). De modo que, este equipo MPLC permite aislar proteínas en un menor tiempo y eliminar contaminantes comparado con los sistemas cromatográficos convencionales, las cuales pueden ser usados en alguna etapa de purificación en la caracterización de una proteína. Por lo cual, consideramos que la metodología usada fue idónea para obtener a la primera isoforma PLA₂ ácida denominada BaPer-PLA_{2a} de la serpiente peruana *Bothrops atrox*.

Así mismo, esta metodología fue similar en otros trabajos reportados para el aislamiento de PLA₂ ácidas en diferentes serpientes del género *Bothrops* sp. (Santos-Filho *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2010), mientras que en otros trabajos emplearon a la HPLC en fase reversa en uno de sus pasos de purificación (Andriao-Escarso *et al.*, 2002; Ketelhut *et al.*, 2003; Cogo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Santos-Filho *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2012; Silveira *et al.*, 2013; Barbosa *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2017; Resende *et al.*, 2017). Si bien es cierto que la RP-HPLC de alta presión, es el más usado en la purificación de proteínas y otros componentes en diferentes muestras ya que ofrece grandes ventajas. Sin embargo, también se debe considerar otros sistemas de purificación que ofrecen las mismas ventajas como el MPLC de presión media (figura 12).

6.2. CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA

Dentro de las características bioquímicas de la BaPer-PLA_{2a}, en principio se halló su peso molecular el cual fue determinado por SDS-PAGE, obteniendo un peso de ~14.5 kDa en condiciones no reductoras (Figura 17) mientras que en condiciones reductoras muestra un peso molecular de ~15 kDa (imagen no mostrado). Este resultado es similar con el peso molecular de otras PLA₂ ácidas del veneno de diferentes serpientes, el cual también fue determinado por SDS-PAGE, así tenemos: 15.8 kDa en *Bothrops pauloensis* (Rodrigues *et al.*, 2007), 15 kDa en *B. pauloensis* (Barbosa *et al.*, 2013), ~14.5 kDa en *B. asper* (Posada *et al.*, 2017), 14 kDa en *B. pirajai* (Teixeira *et al.*, 2011), ~14 kDa en *Agkistrodon piscivorus leucostoma* (Resende *et al.*, 2017), de 15-16 kDa en *B. asper* (Fernández *et al.*, 2010), 14 kDa en *B. moojeni* (Silveira *et al.*, 2013), 15 kDa en *Porthidium nasatum* (Vargas *et al.*, 2012), de 15 kDa en *B. jararacussu* (Ketelhut *et al.*, 2003) y de alrededor de 15 kDa en *B. moojeni* (Santos-Filho *et al.*, 2008). Por lo tanto, las enzimas fosfolipasas A₂ ácida son proteínas de bajo peso molecular. Además, el tratamiento con β-mercaptoetanol confirma que es monomérica (una sola cadena), resultado también obtenidos con otras isoformas de PLA₂ ácidas (Santos-Filho *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2017; Resende *et al.*, 2017; Vargas *et al.*, 2012). Adicionalmente, su punto isoeléctrico teórico de la BaPer-PLA_{2a} fue 4.41, deducido de la estructura primaria de aminoácidos, la misma que fue obtenido de su cDNA, del mismo modo también fue obtenido en otros trabajos en la determinación del punto isoeléctrico en otras isoformas ácidas (Cogo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2010; Barbosa *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2017). Sin embargo, algunas investigaciones emplean la técnica de isoelectroenfoque o electroforesis en dos dimensiones para determinar su punto isoeléctrico experimental, el cual es casi cercano al teórico (Rodrigues *et al.*, 2007; Teixeira *et al.*, 2011; Resende *et al.*, 2017; Posada *et al.*, 2017).

Por otro lado, la actividad enzimática de la BaPer-PLA_{2a} fue determinada por dos metodologías: la primera por el método de retardo de coagulación de la emulsión de yema de huevo (Vidal y Stoppani, 1971) y el segundo usando el sustrato fosfatidilcolina (Araujo y Radvanyi, 1987; Oliveira y Palma, 1998). En el primer ensayo se logró medir la actividad enzimática y hacer el seguimiento de la enzima

en estudio durante los pasos de purificación y de cada fracción, llegando a obtener en la primera etapa de purificación un valor de actividad enzimática específica de 7.14 U/mg, en la segunda etapa fue de 16.3 U/mg y en la tercera etapa de 34 U/mg (tabla 17), mientras que con el segundo método, se evaluó a la proteína pura en la fracción 1 (F1) con la cual se obtuvo una actividad específica de 178 U/mg a partir de 0.37 µg, mientras que con el veneno crudo con 10 µg se obtuvo una actividad de 3.25 U/mg (figura 18). Este último resultado del veneno crudo es casi cercano al obtenido por el método de yema de huevo con un promedio de 2.3 U/mg (tabla 17). Por lo tanto, se demostró que este segundo método usando el sustrato fosfatidilcolina es mucho más sensible y se emplea menos cantidad de proteína para medir actividad enzimática, aunque requiere un poco más de tiempo en su ejecución, ya que se tienen que estandarizar ciertos parámetros. Por otra parte, ambos métodos también fueron empleados en algunas investigaciones para complementar los resultados de la actividad enzimática de fosfolipasa A₂ (Inga *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2010; Ortiz *et al.*, 2012). En los resultados de Lazo *et al.* (1998), reportaron resultados similares al presente trabajo cuando usaron al sustrato fosfatidilcolina, en la cual empleó menos cantidad de proteína purificada y obtuvieron una elevada actividad enzimática específica. Sin embargo, en otros estudios para determinar la actividad enzimática de la PLA₂ ácida han usado como sustrato a fosfolípidos fluorescentes (Rodrigues *et al.*, 2007; Santos-Filho *et al.*, 2008; Teixeira *et al.*, 2011), asimismo fue usado el sustrato sintético cromogénico ácido 4-nitro-3-octanoiloxi benzoico (NOBA) (Cogo *et al.*, 2006; Resende *et al.*, 2017; Posada *et al.*, 2017), los cuales aparentemente resultan ser métodos más sensibles y de mayor precisión para determinar la actividad enzimática. Si bien existen métodos más sensibles para medir la actividad de PLA₂ como los ya mencionados, el método desarrollado por Vidal y Stoppani, (1971) permitió hacer el seguimiento rápido de la enzima en cada fracción y en las etapas de purificación, tomando en consideración que se pretendió ubicar a la enzima para otros fines posteriores de caracterización y no calcular su actividad enzimática específica con tanta rigurosidad ya que como se ha demostrado hay diferencias cuantitativas entre el uso del sustrato de yema de huevo y fosfatidilcolina.

Así mismo, mucho se ha discutido acerca de la validez del método enzimático de prolongación del tiempo de coagulación usando yema de huevo, ya que se trata de un sustrato heterogéneo. Sin embargo, el método es absolutamente idóneo para fines prácticos teniendo resultados reproducibles, además de no ser tan costoso, sencillo de realizar y permite el seguimiento de la enzima. Por otro lado, el método colorimétrico con el sustrato fosfatidilcolina tiene la ventaja de presentar una alta sensibilidad y emplear poca cantidad de muestra de la enzima en el ensayo. Asimismo, si bien los métodos en los que se emplea NOBA o fosfolípidos fluorescentes pueden permitir encontrar en mayor precisión la actividad enzimática, estos también podrían elevar los costos en la investigación.

6.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

La proteína BaPer-PLA_{2a} tiene una alta actividad enzimática y en la determinación de la actividad miotóxica se realizó ensayos *in vivo* usando ratones albinos de la cepa Balb/c. Se inoculó 30 µg en un volumen de 100µL la BaPer-PLA_{2a}, obteniendo un valor de actividad miotóxica de 224 U/L la cual es un valor similar al blanco y también fue reportado en otros trabajos (Santos-Filho *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2017). En cambio, usando una cantidad de 20 µg/100µL de la isoforma de PLA₂ básica miotóxica alcanzó una actividad de creatina quinasa de 740 U/L, la cual nos permite concluir que la isoforma de PLA₂ ácida denominada BaPer-PLA_{2a} carece de actividad miotóxica (figura 19). Estos primeros resultados demuestran que si bien la enzima BaPer-PLA_{2a} tiene una alta actividad enzimática para catalizar fosfolípidos en yema de huevo y fosfatidilcolina, liberando ácidos grasos y lisofosfolípidos, no necesariamente se relaciona con la actividad miotóxica. Estos resultados similares fueron obtenidos en otras fosfolipasas A₂ ácidas las cuales carecen de efecto miotóxico, pero presentan otros efectos biológicos tales como: hipotensiva, anticoagulante, neurotóxica, bactericida e inhibición de la agregación plaquetaria (Adriano-Escarso *et al.*, 2002; Murakami *et al.*, 2006; Silveira *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2017). Adicionalmente, los resultados de Fernández *et al.* (2010), demuestran que la fosfolipasa A₂ ácida (BaspPLA_{2-II}) es catalíticamente activa sobre el sustrato fosfatidilcolina, pero carece de actividad

miotóxica obteniendo valores iguales al blanco (PBS) y superados por la miotoxina (Mt-I) con un valor de ~3800 U/L. Sin embargo, hay otros estudios donde confirman que la isoforma de PLA₂ ácida tiene actividad miotóxica (Santos-Filho *et al.*, 2008; Cogo *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2017). Algo interesante es que cuando a la isoforma ácida BpirPLA₂-I del veneno de la serpiente de *B. pirajai*, se inactiva el residuo histidina48, la cual inicia la actividad enzimática, con bromuro de bromofenacilo (BPB), la actividad enzimática se anula en un 100 % y decae drásticamente el efecto edemático e hipotensivo (Teixeira *et al.*, 2011) y el mismo efecto se observa en la isoforma ácida BmooTX-I cuando se une con BPB lo cual conduce a una disminución de la actividad miotóxica e inhibición de la agregación plaquetaria en un 70 % (Santos-Filho *et al.*, 2008). Asimismo, se demostró cuando se formó el complejo entre Bp-PLA₂ - BPB, perdiendo la actividad enzimática en un 95 %, actividad miotóxica en un 84 % e inhibición de agregación plaquetaria en 89 % en el veneno de *B. pauloensis* (Rodrigues *et al.*, 2007), al igual que el efecto citotóxico de Asp49PLA₂ y Lys49PLA₂ (Mora-Obando *et al.*, 2014). Esto hace pensar que, efectivamente, en algunos casos la actividad catalítica no necesariamente se relaciona con el efecto miotóxico mientras que en otros casos de isoformas ácidas tiene una relación directa la actividad enzimática con la miotoxicidad y también con otros efectos biológicos. Por otra parte, el sentido de existencia de la BaPer-PLA_{2a} en el veneno de la serpiente *B. atrox*, probablemente, tendría algunos de los efectos biológicos mencionados u otros aún no conocidos, ya que esta enzima es un componente importante en el veneno por lo cual tiene que ser expresado para cumplir funciones importantes en la fisiología de la serpiente y en su dieta.

Por otro lado, los resultados de los ensayos de la combinación entre la BaPer-PLA_{2a} y la isoforma PLA₂ básica miotóxica, sugieren un efecto sinérgico que probablemente podría ocurrir en los accidentes por mordedura de serpientes. Inicialmente la isoforma básica llegó a una actividad miotóxica de 740 U/mg, mientras que en la combinación se obtuvo un incremento de hasta 915 U/mg de miotoxicidad, lo que equivale a un incremento de un 21.4 % (figura 19).

Este hecho relevante en esta investigación fue el hallazgo del incremento de la actividad miotóxica cuando se combinan las isoformas BaPer-PLA_{2a} y miotóxica

básica, lo que sugiere acción sinérgica y daño al tejido muscular. Este mismo resultado fue reportado con la combinación de dos isoformas Asp49PLA₂ y Lys49PLA₂ básicas miotóxicas del veneno de la serpiente *Bothrops asper*, en este caso, no sólo potenció la miotoxicidad en más del 30 %, sino también la citotoxicidad en casi el 50 %. Además, realizaron la combinación de una isoforma Asp49PLA₂ ácida y la Lys49PLA₂ básica miotóxica demostrando el sinergismo en la citólisis en células C2C12 (Mora-Obando *et al.*, 2014)

Por otro lado, esta investigación sobre el efecto sinérgico abre la posibilidad de proponer la hipótesis sobre el mecanismo sinérgico. De modo que Mora-Obando *et al.* (2014), proponen que la actividad enzimática de Asp49PLA₂ formarían nuevos sitios aniónicos (ácidos grasos y lisofosfolípidos), los cuales facilitarían la unión de la miotoxina Lys49PLA₂ a través de la interacción electrostática en dichos sitios la cual incrementaría el daño a la membrana celular. Asimismo, se evidenció el sinergismo entre dos isoformas básicas, Asp49 y Lys49, del veneno de *Bothrops diporus* las cuales tienen diversos efectos biológicos, pero en la combinación se demostró un incremento de la citotoxicidad en un 50 % (Bustillo *et al.*, 2019). Adicionalmente, se combinó a la PLA₂ de diferentes serpientes y la toxina Melitina del veneno de abeja con la PLA₂ de serpientes, lo cual demostró el incremento del efecto de lisis sobre células humanas queratinocitos inmortalizados, los cuales forman un fuerte y muy fuerte sinergismo. Esto permitió proponer una hipótesis sobre el mecanismo sinérgico (Pucca *et al.*, 2020).

Por otra parte, se sabe que las fosfolipasas A₂ son monómeros, aun que también pueden formar complejos como: homodímeros, heterodímeros, heterotrimeros o heteropentameros (Arni y Ward, 1996; Kini, 2003; Magro *et al.*, 2004; Lomonte y Gutiérrez, 2011), lo cual explicaría la probable formación de un homodímeros entre la isoforma ácida BaPer-PLA_{2a} y la isoforma básica miotóxica, la cual potenció el efecto miotóxico (figura 19). Por ello, esto abre un camino interesante de investigación sobre el mecanismo sinérgico y la neutralización de la actividad miotóxica a partir de la inhibición de ambas no sólo de la miotóxica básica, sino también de la enzima BaPer-PLA_{2a}.

6.4. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y ESTRUCTURAL

La caracterización molecular de la BaPer-PLA_{2a} de *B. atrox* se basó en la amplificación del cDNA del gen de la PLA₂ ácida y su posterior secuenciamiento y a través de herramientas bioinformáticas se pudo traducir a la estructura primaria, y el modelamiento de la estructura secundaria y terciaria de la proteína nativa (BaPer-PLA_{2a}). A partir del veneno liofilizado y glandular se pudo aislar el RNA total y obteniendo más cantidad del tejido glandular (tabla 18). No obstante, esto implica el sacrificio del espécimen que para efectos de la presente investigación no es adecuado y atenta contra los principios de conservación de la especie.

Se obtuvo un amplificado del cDNA de un peso de ~480 pb por PCR (figura 20), mientras que cuando se secuenció dicho amplificado se obtuvo una longitud de 372 pb, la que codifica una proteína madura de 124 residuos de aminoácidos, sin considerar el péptido señal (figura 22). Asimismo, se confirmó el fragmento de lectura abierta (*ORF*) del gen de la PLA₂ ácida sin considerar al péptido señal por lo cual no inicia desde codón de inicio (ATG) de la metionina del péptido señal para completar todo el *ORF* (figura 21). Este resultado inicial es comparable a los resultados encontrados en otras fosfolipasas A₂ ácidas del veneno de diferentes serpientes como en *Bothrops jararacussu* cuya longitud del cDNA es de 366 pb, que codifica una proteína madura de 122 residuos de aminoácidos (Roberto *et al.*, 2004a), en *B. pirajai* tiene una isoforma ácida cuyo cDNA es de 366 pb que codifica una proteína madura de 122 residuos (Teixeira *et al.*, 2011), un cDNA de 417 pb, codifica una proteína de 122 residuos de aminoácidos, la cual incluye el péptido señal de 16 residuos (Barbosa *et al.*, 2013), en *Lachesis muta* un cDNA de 414 pb codifican una proteína de 138 residuos de aminoácidos, incluyendo el péptido señal (Jiménez *et al.*, 2010) y en BmooPLA₂ tiene un cDNA de 414 pb, cuya proteína madura es de 138 residuos de aminoácidos (Silveira *et al.*, 2013). Este resultado demuestra que la secuencia de nucleótidos del gen de la PLA₂ ácida es relativamente pequeño y podría considerarse factible su clonamiento para su caracterización estructural y funcional, ya que la extracción constante del veneno de la serpiente para uso en investigación básica y aplicada se requiere ciertas cantidades del veneno y eso implica estresar al animal y en algunos casos sacrificar al animal, además de las autorizaciones correspondientes la cual dificulta o retrasa

la obtención de dichos animales, por lo que clonar el gen facilitaría la investigación de los componentes del veneno, así como la conservación y preservación del espécimen.

Así mismo, cuando se realizó el alineamiento múltiple de la BaPer-PLA_{2a} con otras PLA₂ ácidas del género *Bothrops* sp. se confirmó regiones altamente conservadas a nivel de la estructura primaria, tales como: el *loop* de unión al ion Ca²⁺ cuyos residuos son Y28, G30, G32 y D49, el centro catalítico con los residuos de aminoácidos H48, D99, Y73 y Y52, además los 14 residuos de cisteína (C) que forman los siete enlaces disulfuro (S-S) característico de las PLA₂ del grupo IIA de la familia Viperidae, por lo cual permite concluir que la BaPer-PLA_{2a} pertenece al subgrupo IIA (GIIA) y la clase D49PLA₂ de las fosfolipasas A₂ ácidas (figura 23). Este último residuo, el ácido aspártico en la posición 49 (D49) es altamente conservado y se enlaza con el ion Ca²⁺ (figura 23). Este resultado es similar a los reportado en diversas investigaciones en las cuales han realizado un alineamiento múltiple de PLA₂ ácidas del género *Bothrops* sp. encontrando las regiones conservadas de la estructura primaria (Santo-Filho *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2013; Posada *et al.*, 2017; Fernández *et al.*, 2010; Cogo *et al.*, 2006; Teixeira *et al.*, 2011). Esto probablemente a que dichas regiones son trascendentes para el funcionamiento de la enzima y la sobrevivencia de la serpiente en un hábitat hostil y complejo, por lo que una mutación en algún residuo de las regiones conduciría a una posible extinción de la enzima fosfolipasa A₂ ácidas y de la misma especie. Además, lo interesante es que la fosfolipasa A₂ ácida (accesión: ATP66581) del veneno de la serpiente *Bothrops asper* de Colombia presenta un 83 % de identidad de secuencia de aminoácidos con la BaPer-PLA_{2a}, este resultado que arroja el alineamiento puede ser debido a que se comparte la selva amazónica con dicho país y mediante la cual los especímenes pueden migrar de un punto a otro o ser desplazados por el hombre a causa de alguna creencia. Otro caso es con la isoforma ácida (accesión: P86389) del veneno de *B. asper* de Costa Rica la cual tiene un 81.4 % de identidad con la enzima en estudio. Adicionalmente, presenta un porcentaje menor del 78 % con la isoforma ácida (P81243) de *B. jararaca*, 77.4 % con *B. moojeni* (G3DT18) y 75 % de identidad con *B. jararacussu* de Brazil (figura 23). Además, en el caso de las PLA₂ homólogas tienen en la posición 49 a la lisina

en lugar del ácido aspártico, esta mutación conduce a la pérdida de la actividad enzimática (Núñez *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2016).

Por otro lado, el modelo estructural teórico de la BaPer-PLA_{2a} presenta estructuras terciarias conservadas e iguales a otras PLA₂ ácidas del grupo IIA (GIIA) en la familia Viperidae. La enzima en estudio fue modelada por homología con la estructura de la cadena A de la fosfolipasa A₂ ácida (PDB: 1U73.1A) de *Bothrops jararacussu* de Brasil, la cual fue investigada por cristalografía con una resolución de 1.9 Å (Magro *et al.*, 2004). La enzima en estudio tiene un 76.5 % de identidad de secuencias con 1U73.1A de acuerdo con SWISS-MODEL modelo RIBBON (Carson, 1997) (figura 24). Este porcentaje de identidad puede ser debido en gran medida a que se comparte la región amazónica entre Perú y Brasil, la cual probablemente ocasiono una migración de las serpientes de un lugar a otro o trasladadas por los migrantes. Los resultados encontrados en investigaciones por cristalografía de rayos-X de otras fosfolipasa A₂ permiten realizar el modelamiento estructural teórico de varias proteínas para relacionar su estructura y función (Scott *et al.*, 1990; Arni y Ward, 1996; Magro *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006; Kang *et al.*, 2011).

Las regiones de la estructura primaria de la BaPer-PLA_{2a} permiten formar las estructuras secundarias conservadas y finalmente a la estructura terciaria. La enzima presenta tres α -hélices principales (h1, h2, h3), un α -hélice corto, una hoja- β antiparalelo (β -wing) y la región C-terminal (figura 24). La α -hélices 1 (h1), comprende la región N-terminal la cual formar parte del canal hidrofóbico por el cual ingresan los fosfolípidos, mientras que las α -hélices 2 y 3 (h2 y h3) son largos y antiparalelos y son el núcleo de la proteína, ya que comprenden la región catalítica constituidos por los residuos H48, D49, D99, Y73 y Y52, las cuales participan directamente en la hidrólisis de fosfolípidos y la posterior liberación de ácido grasos y lisofosfolípidos. Asimismo, el *loop* de unión al ion Ca^{2+} cuyos residuos son Y28, G30, G32 y D49 (figura 24). La BaPer-PLA_{2a} en la región C-terminal la cual contiene al residuo cisteína (Cys133) que forma el enlace disulfuro con Cys51, por lo que dicho enlace está presente únicamente en las PLA₂ de la familia Viperidae (Arni y Ward, 1996; Kang *et al.*, 2011; Magro *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2006). De este modo, la enzima en estudio tiene un 76.5 % de identidad de secuencias con el

monómero A (1U73.1A), la cual tiene actividad hipotensiva, anticoagulante, edemática y bactericida (Magro *et al.*, 2004), Lo cual hace pensar que probablemente algunos o varios de estos efectos biológicos también lo podría presentar BaPer-PLA_{2a}.

Así mismo, este modelamiento estructural teórico de la enzima en estudio fue también reproducido en otras investigaciones tomando como modelos algunas fosfolipasas A₂ ácidas depositadas en el banco de datos de proteínas (PDB), obteniendo resultados muy similares con las estructuras terciarias investigadas por cristalografía (Núñez *et al.*, 2004; Fernández *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011). Claramente se evidencia el centro catalítico formado por las α -hélices (h2 y h3), en los cuales se encuentran los residuos H48, D49, Y52 y D99 de la PLA₂ ácida del veneno de la serpiente *B. jararacussu* (Katelhut *et al.*, 2003) y *B. moojeni* (Silveira *et al.*, 2013). En el trabajo de Posada *et al.* (2017), demostraron el modelamiento teórico BaColPLA₂ ácida con la cadena X de PLA₂ ácida de *B. jararacussu* (PDB: 1UMV X), teniendo una identidad del 78 % identificado. Del mismo modo, Resende *et al.* (2017), realizaron la estructura teórica de AplTx-I ácida del veneno de la serpiente *Agkistrodon piscivorus* con la PLA₂ ácida (PDB:1M8R), mediante el cual identificaron las características estructurales (tres α -hélices, un β -wing, *loop* de unión al ion Ca²⁺, un C-terminal y un centro catalítico). Este resultado parcial de la estructura de la enzima BaPer-PLA_{2a} permite concluir que se pueden identificar regiones sumamente conservados dentro de la familia Viperidae, así como la identificación de residuos de aminoácidos blanco para neutralizar a las fosfolipasas A₂ ácidas.

Por otra parte, el diagrama ramachandran ha permitido deducir que el 95.9 % de los residuos de aminoácidos presentes en la estructura se encuentran en la zona permitida (figura 25), lo cual es similar a otros trabajos, donde también desarrollan el diagrama para apoyar la estructura teórica (Silveira *et al.*, 2013; Resende *et al.*, 2017). Por lo tanto, del análisis bioinformático y estructural colocan en cercanía de congruencia de identidad de la secuencia proteica deducida con la proteína purificada en el presente trabajo (BaPer-PLA_{2a}), esto porque los cebadores diseñados fueron en base a las regiones altamente conservadas en los extremos

del gen de varias PLA₂ ácidas y la enzima pertenece dentro de la clase de D49PLA₂ ácidas

6.5. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

El árbol filogenético muestra la historia evolutiva basado en las secuencias de la estructura primaria de la BaPer-PLA_{2a} comparado con catorce isoformas ácidas, tres isoformas básicas y como grupo externo la PLA₂ secretora del ser humano. Los resultados conducen, marcadamente, a la divergencia en dos clases: D49PLA₂ ácidas y D49PLA₂ básicas (figura 26). Este resultado inicial permite concluir que la proteína en estudio esta agrupada evolutivamente con otras isoformas de D49PLA₂ ácidas y diferenciadas con las D49PLA₂ básicas. A su vez, dentro de la clase D49PLA₂ ácidas, la enzima BaPer-PLA_{2a} de *Bothrops atrox* forma un sub grupo cercanamente con las fosfolipasas A₂ ácidas de las serpientes *B. jararaca* (BJ-PLA₂), *B. insularis* (BinTX-I), *B. pirajai* (BpirPLA₂-I) y *B. jararacussu* (1U73A, 1UMVX, 1ZLB1) las cuales son de Brasil, mientras que también comparte cierta cercanía con *B. asper* (BaspPLA₂-II) de Costa Rica y *B. asper* (ATP66581) de Colombia (figura 26). Esto puede ser probablemente a que compartimos el territorio de la selva amazónica con dichos países, asimismo otros estudios confirman la separación en las dos clases; D49PLA₂ ácidas y básicas (Cogo *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2010; Teixeira *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2013). No obstante, es curioso que se comparta cierta cercanía con la PLA₂ acida de la serpiente *B. asper* de Costa Rica, esto puede ser debido probablemente, a que las serpientes que habitaron en la selva amazónica hayan sido introducidas durante el proceso de migración hacia la selva de Costa Rica ya que compartimos el mismo continente, aunque también podría haber ocurrido lo contrario. Adicionalmente, el programa empleado para la construcción del árbol filogenético del presente estudio fue el método Neighbor-Joining, lo cual también fue empleado por (Cogo *et al.*, 2006; Barbosa *et al.*, 2013), mientras que en otros estudios usaron el método maximum likelihood (Fernandez *et al.*, 2010) y el análisis filogenético bayesiano (Teixeira *et al.*, 2011).

Por lo que usando uno u otro método conduce a la agrupación y separación en clases de las D49PLA₂ ácidas y D49PLA₂ básicas. Lo interesante es que a lo largo

de la historia evolucionaria del gen PLA₂ ácidas o básicas, han conservado las regiones que determinan la función de la enzima, lo cual en cierto modo, a las serpientes les permitió la sobrevivencia y adaptarse a las diferentes condiciones ambientales, de modo que dichas enzimas no solamente fueron útiles para la digestión de la presa, si no como un mecanismo de defensa contra los depredadores llegando niveles altos de especialización de las diferentes isoformas ácidas o básica con efectos biológicos también diversos.

6.6. CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DE LA rPLA_{2a}

El clonamiento se desarrolló en la bacteria *E. coli*, cepa Top10F' en el vector de expresión pPicZαA, de manera que inicialmente se clono el gen de la PLA₂ ácida en el sistema bacteriano. En muchos trabajos de investigación usan inicialmente a la cepa de *E. coli* para la clonamiento del gen (de Oliveira *et al.*, 2003; Roberto *et al.*, 2004; Guerrero-Garzon *et al.*, 2018), aunque también lo usan para la expresión de las proteínas heterólogas.

El amplicón obtenido fue secuenciado parcialmente y alineado con la fosfolipasa A₂ ácida nativa (BaPer-PLA_{2a}) para confirmar que se trata de una isoforma ácida ya que comparten las mismas regiones conservadas de la estructura primaria (figura 27). Asimismo, la transformación de Top10F', fue confirmado con el crecimiento de nueve colonias en la placa *petri* conteniendo el antibiótico Zeocina, lo cual sugiere que el gen de PLA₂ ácida fue insertado en el vector de expresión pPicZαA (figura 28). Este resultado inicial también fue empleado en otros trabajos usando a *E. coli* cepa DH5α para el clonamiento y propagación del cDNA del gen de la PLA₂ ácida del veneno de la serpiente *B. jararacussu* cuya función es inhibir la agregación plaquetaria, es bactericida y antitumoral (Roberto *et al.*, 2004a; 2004b; De Lima, 2013). Asimismo, en otros estudios usaron a *E. coli* BL21(DE3) para el clonamiento y la expresión de la proteína heteróloga (de Oliveira *et al.*, 2003; Roberto *et al.*, 2004b), en la K49PLA₂ básica miotóxica de la serpiente *Agkistrodon contortrix* (Giuliani *et al.*, 2001), la cepa azul XL-1 (Boettner *et al.*, 2002), la Origami Gold DE3 en la expresión de una neurotoxina tres dedos (3FTx) del veneno de *Micrurus diastema* (Guerrero-Garzon *et al.*, 2018). Esto claramente demuestra que en un primer paso antes de la expresión de una proteína heteróloga se debe usar a la

bacteria *E. coli* para el clonamiento del gen ya que esta tiene la gran ventaja de crecer grandes cantidades de colonias de bacterias en poco tiempo, con lo cual tambien se obtiene el gen de interes en las mismas dimensiones.

Por otra parte, para confirmar la presencia del inserto en el vector de expresión pPicZαA, se realizó una PCR de las colonias bacterianas transformantes, con lo cual se obtuvo un amplificado de ~500 pb de la colonia número 3 (figura 29), resulta un peso molecular cercano a la proteína nativa BaPer-PLA₂ la cual se obtuvo ~480 pb. Este segundo resultado confirma que el gen de interés esta insertado en el vector de expresión, ademas el resultado es cercanamente similar a otras investigaciones realizadas en la K49PLA₂ homóloga, en la cual realizarón una PCR de colonia para confirmar la presencia del inserto en el vector, obteniendo un peso de ~500 bp (De Lima, 2013; 2017). Este resultado proporciona una evidencia parcial. No obstante, la técnica PCR de colonia del presente estudio fue hecho empleando un cebador altamente especifico propio del vector pPicZαA y el cebador diseñado, la cual fue un procedimiento similar al usado por Boettner *et al.* (2002).

El plásmido recombinante pPicZαA-rPLA₂ fue purificado y cuantificado obteniendo el valor de 73 ng/ μL (tabla 19). En la figura 30, se confirma el plásmido recombinante purificado, en la cual se observa la diferencia del peso molecular del plásmido recombinante (P1) y los controles negativos (P2 y P3). Esta tercera evidencia apoya la inserción del gen de la fosfolipasa A₂ ácida a pPicZαA. Asimismo, el plásmido recombinante pPicZαA-rPLA₂ fue digerido con la enzima de restricción *PmeI* para linealizarlos en L1 y L2, mientras que los controles negativos fueron L3, L4, L5 y L6 (figura 31). Este resultado complementa y confirma la diferencia de pesos moleculares entre el plasmido recombinante y los controles negativos, la cual es similar a lo reportado en otros trabajos (De Lima, 2013). En esta primera etapa de clonamiento se puede afirmar que el mismo fue exitoso, es decir el gen de la PLA₂ ácida esta insertado en el vector de expresión, lo cual permite considerar y ejecutar la segunda etapa la cual corresponde a la expresión del gen de interés en la levadura *Pichia pastoris* para su posterior caracterización en la actividad enzimática y miotóxica.

Los ensayos de expresión de la proteína recombinante rPLA_{2a} se empleó el sistema eucariótico *Pichia pastoris*, cepa GS115 y KM71H, se probaron ambas cepas con el objeto de tener más probabilidad de éxito en la transformación y expresión de la proteína heterólogas. Sin embargo, los resultados no fueron favorables (figura 32), probablemente debido a la poca cantidad de plásmido recombinante linealizado 2.5 µg, lo cual fue muy poco para transformar a la cepa GS115 (figura 32). Asimismo, se sugiere por otros investigadores que la cantidad de plásmido recombinante linealizado debe ser entre 5-10 µg para transformar a *P. pastoris* debido a que tiene que atravesar una serie de compartimentos, como la pared celular, citoplasma y el núcleo, y en dicho recorrido experimenta degradación por parte de las enzimas del hospedero al identificar un DNA foráneo. Por lo tanto, se requiere de buena cantidad de pPicZαA-rPLA₂ linealizado para tener éxito en la transformación en *P. pastoris*. Además, posiblemente pudo deberse a la optimización de algún otro parámetro que no se tomó en consideración en la transformación.

Por otro lado, las cepas GS115 y KM71H fueron usadas debido a que GS115 forma una mayor cantidad de biomasa celular en menor tiempo, lo cual facilita la manipulación de GS115. No obstante, la cepa KM71H tiene la ventaja de expresar una mayor cantidad de proteína recombinante y necesita menos cantidad del inductor metanol. Asimismo, lo interesante de la cepa KM71H es que crece lentamente y sobre expresa más proteína recombinante (figura 15) (Gomes, 2013, 2017; Isabel *et al.*, 2016). Por ello, generalmente son más usadas la cepa KM71H en lugar de GS115. A pesar de no haber transformado el plasmido recombinante pPicZαA-rPLA_{2a} y no expresar la proteína recombinante en *P. pastoris* por falta de optimizar ciertos parámetros. Sin embargo, es bien sabido el uso de *Pichia pastoris* en la cual se han expresando 5000 proteínas recombinantes de acuerdo a la web www.pichia.com. Además, ha sido muy efectivo, produciendo proteínas solubles y funcionales de fosfolipasa A₂ en diferentes especies (Filkin *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2007; Jan-Philipp *et al.*, 2017). Asimismo, se insertó el gen de BpSP-II de la serpiente *B. pauloensis* y transformando a la cepa KM71H para su expresión, obteniendo una proteína recombinante con actividad proteolítica (Isabel *et al.*, 2016).

Por lo tanto, los resultados en otras investigaciones demuestran el éxito del uso del sistema *Pichia pastoris* para expresar proteínas recombinantes funcionales, pero en algunos casos hace falta optimizar el proceso para tener más probabilidad de éxito en la transformación, como la cantidad del plásmido linealizado, condiciones del electroporador Voltaje, capacitancia, resistencia y considerar la fase de crecimiento celular (Cregg y Russell, 1998; Wu y Letchworth, 2004).

VII. CONCLUSIONES

- Se establece una metodología de purificación de la primera isoforma ácida de PLA₂ (denominada BaPer-PLA_{2a}) a partir del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* de Perú.
- BaPer-PLA_{2a} posee actividad enzimática sobre lipoproteínas de yema de huevo y fosfatidilcolina. Presenta un peso molecular de ~14.5 kDa en condiciones no reductoras y su punto isoeléctrico teórico es 4.41.
- La enzima carece de actividad miotóxica, pero incrementa la actividad miotóxica en 21.58 % de la PLA₂ básica homóloga, la cual es una miotoxina.
- El cDNA tiene una longitud de 372 pb que codifica a una proteína madura de 124 residuos de aminoácidos, la cual pertenece a la clase D49PLA₂ ácidas.
- La enzima BaPer-PLA_{2a} presenta regiones conservadas en su centro catalítico (H48, D99, Y73, Y52), un *loop* de unión al Ca²⁺ (Y28, G30, G32, D49) y los catorce residuos de cisteínas (Cys), los cuales forman los siete enlaces disulfuro (S-S).

- El análisis bioinformático coloca en cercanía de congruencia de identidad a la secuencia de residuos de aminoácidos de la proteína deducida con la proteína purificada BaPer-PLA_{2a}.
- La enzima mostró una homología estructural teórica del 76.5 % con la PLA₂ ácida hipotensiva de la serpiente *B. jararacussu* (PDB:1U73.1A).
- El clonamiento desarrollado en *E. coli* Top10F' fue exitoso y confirmando un peso molecular aproximado de ~500 pb.
- El ensayo de transformación en *P. pastoris* GS115 no fue favorable, probablemente debido a la poca cantidad de plásmido recombinante linealizado. Por lo que, no fue posible continuar con el siguiente ensayo de expresión de la proteína recombinante.

VIII. RECOMENDACIONES

- La obtención de una fosfolipasas A₂ ácida no miotóxica, pero que potencia la miotoxicidad señala probable acción sinérgica en este efecto biológico por lo que, es conveniente estudiar más a profundidad *in vivo* para proponer un posible mecanismo entre ambas proteínas.
- Dado que otras PLA₂ ácidas han sido obtenidas bajo la forma recombinante en el sistema *Pichia pastoris*, se recomienda realizar estos ensayos con una mayor cantidad de plásmido recombinante purificado.
- Se recomienda evaluar la posibilidad de desarrollar un antiveneno específico durante la mezcla de PLA₂ ácida y básica miotóxica para neutralizar esta acción biológica y por lo tanto disponer de una herramienta farmacológica eficaz para tratar la miotoxicidad.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ausubel FM, Brent R, Robert EK, David DM, Seidman JG, John AS, Struhl K. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & sons, Inc. 2003.
- Anangi R, Chiu-Yueh C, Chun-ho C, Yi-Chun C, Chu-Chun C, Yuan-ping C, Chia-Hao C, Wen-Yih J, Jia-Hau S, Woei-Jer C. Expression of Snake Venom Toxins in *Pichia pastoris*. Toxin Reviews 2007; 26:169-187
- Araujo AL and Radvanyi F. Determination of phospholipase A₂ activity by a colorimetric assay using a pH indicator. Toxicon 1987; 25(11): 1181-1188
- Arni RK and Ward RJ. Phospholipase A₂ – a structure review. Toxicon 1996; 34 (8): 827-841.
- Andriao-Escarso SH, Andreimar MS, Fontes MRM, Fuly AI, Correa FMA, Rosa JC, Greene LG, Giglio JR. Structure and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from Bothrops jararacussu snake venom. Biochemical Pharmacology 2002; 64: 723-732.
- Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expresion in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. Appl Microbiol Biotechnmol 2014; 98:5301-5317.
- Altenbuchner J and Mattes R. *Escherichia coli*. Produccion of Recombinant Protein. Novel Microbial and Eucaryotic Expression Systems. WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA, Weinheim 2005; 7-37.
- Bollon AP, Barron EA, Berent SL, Bragg PW, Dixon D, Fuke M, Hendrix C, Mahmoudi M, Sidhu RS, Torczynski RM. Recombinant DNA Techniques: Isolation, Cloning, and Expression of Genes. Editado por Bollon, Arthur P. Recombinant DNA Products. CRC Press, Inc. 2018; 1-35

- Balbas P, Soberon X, Bolivar F, Rodriguez RL. The Plasmid, pBR322. Editado by Rodriguez, Raymond L. and David T. Denhardt. Vectors A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses. Butterworth Publishers 1988.
- Barbosa FF, Sergio RG, Naves de Souza DL, Gimenes SN, Castanheira IE, Borges MH, Rodrigues RS, Yoneyama KA, Brandeburgo MI, Rodrigues VM. Molecular Cloning and Pharmacological Properties of an Acidic PLA₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. Toxins 2013; 5: 2403-2419.
- Becker W, Scherer A, Faust C, Kornbluh DB, Scholtes S, Rao E, Hofmann J, Schauder R, Langer T. Afully automated three-step protein purification procedure for up to five sample using the NGC chromatography system. Protein Expression and Purification 2019; 153:1-6.
- Baruah GS, Sarma HK, Bardoloi S, Bora D. Purification and characterization of phenoloxidase from the hemolymph of the healthy and diseased *Antheraea assamensis* Helfer (Lepidoptera: Saturniidae): Effects of certain biological components and chemical agents on enzyme activity. WILEY, Arch. Insect Biochem. Physiol. 2018; e21531.
- Berg OG, Gelb MH, Ming-Daw T, Jain MK. Interfacial Enzymology: The Secreted Phospholipase A₂ –paradigm. Chem. Rev 2001; 101: 2613-2653.
- Boettner M, Prinz B, Holz C, Stahl U, Lang C. High-throughput screening for expression of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology 2002; 99: 51-62
- Bustillo S, Fernandez J, Chaves-Araya S, Angulo Y, Leiva LC, Lomonte B. Isolation of two phospholipase A₂ from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49. Toxicon 2019; 168: 113-121

- Cogo JC, Lilla S, Souza GH, Hyslop S, De Nucci G. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *BIOCHIMIE* 2006; 88: 1947-1959.
- Correa EA, Kayano AM, Dniz-Sousa R, Setubal SS, Zanchi FB, Zuliani JP, Matos NB, Almeida JR, Resende LM, Marangoni S, Da Silva SL, Soares AM, Calderon LA. Isolation, structural and functional characterization of a new Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi urutu* with bacterial potential. *Toxicon* 2016; 115: 13-21
- Chomczynski P and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987; 162(1):156-9.
- Chippaux JP, Williams V and White J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 1991; 29 (11): 1279-1303.
- Cole PA. Chaperone-assisted protein expression. *Structure* 1996; 4(3): 239-242.
- Cerenghino J, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology reviews* 2000; 24: 45-66.
- Cregg JM. *Pichia* Protocols. Human Press Inc., Totowa, NJ. 2007
- Cregg JM. and Russell KA. *Pichia* Protocols. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 1998; 27-39.
- Cregg JM, Barringer KJ, Hesseler AY and Madden KR. *Pichia pastoris* as a Host System for Transformations. *Molecular and Cellular Biology* 1985; 3376-3385.

- Cregg JM, Madden KR, Barringer KJ, Thill GP, Stillman CA. Functional Characterization of the Two Alcohol Oxidase Genes from the Yeast *Pichia pastoris*. Molecular and Cellular Biology 1989; 1316-1323.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, and Higgins DR. Recombinant Protein Expression in *Pichia pastoris*. Molecular Biotechnology 2000; 16: 23-52
- Calvete JJ, Juarez P and Sanz L. Snake venomomics. Strategy and applications. J. Mass Spectrom. 2007; 42: 1405-1414.
- Carson M. Ribbons. Methods in enzymology 1997; 277: 493-505.
- Chenn VB, Arendall WB, Headd JJ, Keedy DA, Immormino RM, Kapral GJ, Murray LW, Richardson JS, and Richardson DC. All-atom structure validation for macromolecular crystallography. Acta Cryst. 2010; D66: 16-21.
- Chandra V, Kaur P, Srinivasan A and Singh TP. Three-dimensional Structure of a Presynaptic Neurotoxic Phospholipase A₂ from *Daboia russelli pulchella* at 2.4 Å Resolution. J. Mol. Biol. 2000; 296: 1117-1126.
- Dennis EA, Cao J, Yuan-Hao H, Magrioti V and Kokotos G. Phospholipase A₂ enzymes: Physical Structure, biological function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. American Chemical Society 2011; 111: 6130-6185.
- De Schutter K., Yao-Cheng L, Tiels P, Hecke AV, Glinka S, Weber-Lehmann J, Rouze P, Van de Peer Y and Callewaert N. Genome Sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. Nature biotechnology 2009; 27(6): 561-570
- Doley R, Zhou X and Kini RM. Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes. Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles. Taylor and Francis Group CRC Press 2010; 173-195.

- Dijkstra BW, Drenth J and Kalk KH. Active site and catalytic mechanism of phospholipase A₂. *Nature*, 1981; 289: 604-606.
- De Lima LFG. Caracterizaco bioquímica e funcional da rBnSP-7: Uma fosfolipase A₂ homologa recombinante de *Bothrops paulensis*. PPGGB-UFU, Tesis de Magister, 2013.
- De Lima LFG. Estudos estruturais com a BnSP-7 nativa e recombinante: uma fosfolipasa A₂ homologa do veneno de *Bothrops pauloensis*. TESIS DOCTORAL-PG-BGA-UNESP, 2017.
- De Oliveira UC, Assui A, Da Silva AR, De Oliveira JS, Lee Ho P. Cloning and characterization of a basic phospholipase A₂ homologue from *Micrurus corallinus* (coral snake) venom gland. *Toxicon* 2003; 42: 249-255.
- Giuliani CD, Lemma MRC, Bandioli AC, Souza DH, Ferreira LL, Amaral AC, Salvini TF, Selistre-de-Araujo HS. Expression of an active recombinant lysine 49 phospholipase A₂ myotoxin as a fusion protein in bacteria. *Toxicon* 2001; 39: 1595-1600.
- Gutierrez JM, and Ownby CL. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon* 2003; 42: 915-931.
- Gutierrez JM, Rucavado A, Chaves F, Diaz C, Escalante T. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon* 2009; 54: 958-975
- Guerrero-Garzon JF, Bernad-Valle M, Restano-Cassulini R, Zamudio F, Corzo G, Alagon A, Olvera-Rodriguez A. Cloning and sequencing of three-finger toxins from the venom glands of four *Micrurus* species from Mexico and heterologous expression of an alpha-neurotin from *Micrurus diastema*. *Biochimie* 2018; 147: 114-121.

- Filkin SY, Chertova NV, Zenin AA, Lipkin AV, Sichev AA, Bityak DS, Sadykhov EG, Popov VO and Fedorov AN. Expression, purification and characterization of recombinant *Streptomyces violaceoruber* phospholipase A₂ overproduced in *Pichia pastoris*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2020.
- Fry BG and Wuster W. Assembling an Arsenal: Origin and Evolution of the Snake Venom Proteome Inferred from Phylogenetic Analysis of Toxin Sequences. *Mol. Biol. Evol.* 2004; 21(5): 870-883.
- Fry BG, Scheib H, Van der Weerd L, Young B, McNaughtan J, Ramjan SF, Vidal R, Poelmann RE and Norman JA. Evolution of an Arsenal, Structure and Functional Diversification of the Venom System in the advanced snakes (Caenophidia). *Molecular and Cellular Proteomics* 2008; 215-243.
- Fernandez J, Gutierrez JM, Angulo Y, Sanz L, Juarez P, Calvete JJ, Lomonte B. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. *Biochimie*, 2010. 92;273-283.
- Huatuco S, Escobar S y Yarleque A. Aislamiento y caracterización parcial de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Ophidia: Viperidae). *Rev. Perú Biol.* 2004; 11(1): 79-86.
- Higgins DR, and Cregg JM. *Pichia* Protocols. Humana Press Inc. Totowa, NJ. 1998.
- Indiris A, Tohda H, Kumagai H, Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010; 86: 403-417.

- Isabel TF, Nunes MC, Pacheco IB, Barbosa LG, Santos-Junior CD, Fernando PP, Franca JB, Henrique-Silvana F, Yoneyama KA, Rodrigues RS, Rodrigues VM. Expression and partial biochemical characterization of a recombinant serine protease from *Bothrops pauloensis* snake venom. *Toxicon* 2016; 115: 49-54.
- Inga R, Vivas D, Palermo D, Mendoza J, Lazo F, Yarleque A. Caracterización biológica y acción de inhibidores de una fosfolipasa A₂ del veneno de *Lachesis muta*. *Rev. peru. Biol* 2010; 17(1): 123-128.
- Invitrogen, Manual of kit EasySelect™ Pichia Expression 2010. Disponible en: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2Feasyselect_man.pdf&title=RWFzeVNlbGVjdCBQaWNoaWEgRXhwcmVzc2lvbiBLaXQ=
- Jiménez KL, Zavaleta A, Izaguirre V, Yarlequé A e Inga R. Clonaje y caracterización molecular *in silico* de un transcrito de fosfolipasa A₂ aislado del veneno de la serpiente peruana *Lachesis muta*. *Rev. Perú Med. Exp. Salud Publica* 2010; 27(4): 532-539.
- Jan-Philipp S, Luttermann T, Geier M, Kalinowski J, Friehs K. Towards Systems metabolic engineering in *Pichia Pastoris*. *Biotechnology advances*, 2017. 10.1016/j.biotechadv.2017.07.009.
- Kohlhoff M, Borges MH, Yarleque A, Cabezas C, Richardson M, Sanchez EF. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. *Journal of Proteomics* 2012; 75: 2181-2195.
- Ketelhut DFJ, de Mello MH, Veronese ELG, Esmeraldino LE, Murakami MT, Arni RK, Giglio JR, Cintra ACO, Sampaio SV. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie* 2003; 85: 983-991.

- Kini MR. Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes in Cell Biology. Animal Toxins, Facts and Protocols. Birkhauser Verlag, 2000; 304-315
- Kini MR. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. Toxicon 2003; 42: 827-840.
- Kini MR. Manjunatha. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venom. Toxicon 2005; 45: 1147-1161.
- Kini MR and Iwanaga S. Structure-function relationships of phospholipase II: charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. Toxicon 1986; 24(9): 895-905.
- Kini MR, and Evans HJ. Structure-Function Relationships of Phospholipases the anticoagulant region of phospholipase A₂. The Journal of Biological Chemistry 1987; 262(30): 14402-144407.
- Kang TS, Georgieva D, Gnov N, Murakami MT, Kumar RP, Kaur P, Kumar S, Dey S, Sharma S, Vrielink A, Betzel C, Takeda C, Arni RK, Singh TP and Kini RM. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. FEBS Journal 2011; 278: 4544-4576.
- Laemmli UK. Cleavage of Structural Protein during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
- Liu A, Xiao-Wei Y, Sha C, Xu Y. Streptococcus violaceoruber Phospholipase A₂: Expression in *Pichia pastoris*, Properties, and Application in Oil Emulsification. Appl. Biochem Biotechnol, 2015. Disponible en: DOI10.1007/s12010-015-1492-7
- Lomonte B. and Gutierrez JM. Phospholipases A₂ from Viperidae Snake Venoms: How do They Induce Skeletal Muscle Damage? Acta Chim. Slov. 2011; 58: 647-659.

- Lomonte B, Rangel J. Snake venom Lys49 myotoxins: from phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. *Toxicon* 2012; 60: 520-530.
- Lomonte B, Pizarro-Cerda J, Angulo Y, Gorvel JP, Moreno E. Try-Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A₂ expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its *in vivo* myotoxic effect. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1461: 19-26.
- Lowry O, Rosebrough R, Farr L and Randall R. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-275.
- Lazo MF, Rodríguez E y Yarleque A. Evaluación comparativa de dos métodos para determinar la actividad de fosfolipasa A₂ en venenos de serpientes. *Rev. Perú. Biol.* 1998; 5(2): 98-102.
- Mora-Obando D, Fernandez J, Montecucco C, Gutierrez JM, Lomonte B. Synergism Between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A₂ Myotoxins of Viperid Snake Venom *In vitro* and *In Vivo*. *PLOS ONE* 2014; 9(10): e109846.
- Murakami MT, Gabdoulkhakov A, Genov N, Cintra AC, Betzel C, Arni RR. Insights into metal ion binding in phospholipase A₂: Ultra high-Resolution crystal Structures of an acidic phospholipase A₂ in the Ca²⁺ free and bound states. *Biochimie* 2006; 88: 543-549.
- Murakami MT, Takemi Y, Sato H and Yamamoto K. Secreted phospholipase A₂ Revisited. *J. Biochem.* 2011; 150(3): 233-255.
- Mejía J, Inga R, Lazo F, Rodríguez E, Yarleque A, y Zavaleta A. Purificación y Propiedades bioquímicas de una fosfolipasa A₂ del veneno de la serpiente *Lachesis muta* “Shushupe”. *Rev. Soc. Quim. Perú* 2006; 2: 86-95.

- Mackessy SP. The Field of Reptile Toxinology Snake, Lizards, and Their Venoms. Ed., by Mackenssy, S.P. Handbook of Venom and Toxins of Reptiles. CRC Press Taylor and Francis Group 2010; 3-19
- Magro AJ, Murakami M, Marcussi S, Soares AM, Arni RK, Fontes RM. Crystal structure of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ in the monomer and dimeric states: insights into its oligomeric states. BBRC 2004; 233: 24-31.
- Malaga O, Pantigoso C, Morante Y, Heredia V, Cardenas J y Yarleque A. Variaciones en la composicion proteica, actividades enzimaticas y biologicas del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (Viperidae) en relacion con la edad. Rev. Peru biol. 2000; 7(2): 161-170
- Navarrete M, Silva W, Vargas E. Las serpientes venenosas de importancia en la salud publica del Perú. Rev. Elec. Vet. 2010; 11. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63614251014>
- Nordén K, Agemark M, Danielson JA, Alexandersson E, Kjellbom P and Johanson U. Increasing gene dosage greatly enhances recombinant expression of aquaporins in *Pichia pastoris*. BMC Biotechnology 2011; 11: 47.
- Nuñez V, Arce V, Gutierrez JM, Lomonte B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. Toxicon 2004; 44: 91-101
- Oliveira MR and Palma MS. Polybiotoxins: a group of phospholipases A₂ from the venom of the neotropical social wasp paulistinha (*Polybia Paulista*). Toxicon 1998; 36(1): 189-199.

- Ortiz C, Lazo F, Bellido C, Gonzales E, Yarleque A. Variacion en la actividad enzimatica del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* “Jergon”, de tres zonas geograficas del Perú. Rev. Perú Exp. Salud Publica 2012; 29(2): 198-205.
- Ofidismo en el Perú, MINSA 2019. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/sala/2019/SE04/ofidismo.pdf>
- Posada AS, Rey-Suarez P, Pereañez JA, Acosta A, Rojas M, Dos Santos MD, Ferreira RS Jr and Nuñez V. Isolation and Functional characterization of an Acidic Myotoxic Phospholipase A₂ from colombian *Bothrops asper* venom. Toxins 2017; 9: 342.
- Pantigoso C, Escobar E y Yarleque A. Asilamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente de *Bothrops brazili* HOGE,1953 (Ophidia: Viperidae). Rev. Perú Biol. 2001; 8(2): 106-148.
- Pantigoso C, Escobar E y Yarleque A. Accion de la miotoxina del veneno de *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae). Rev. Peru Biol. 2002; 9(2): 74-83.
- Pucca MB, Ahmadi S, Cemi FA, Ledsgaard L, Sorensen SV, McGeoghan FT, Stewart T, Sshoof E, Lomonte B, Ulrich auf dem Keller, Arantes EC, Caliskan F and Laustsen AH. Unity Makes Strength: Exploring Intraspecies and Interspecies Toxin Synergism between Phospholipase A₂ and Cytotoxins. Frontiers in Pharmacology 2020; 11: 611
- Renetseder R, Brunie S, Dijkstrat VW, Drenth J, and Sigler B. A Comparison of the Crystal Structures of Phospholipase A₂ from Bovine Pancreas and *Crotalus atrox* Venom. The Journal of Biological Chemistry, 1985; 260 (21): 11627-11634.

- Ramachandran GN, Ramakrishnan C., Sasisekharan V. "Stereochemistry of polypeptide chain configurations". Journal of Molecular Biology 1963; 7: 95–9.
- Resende LM, Almeida JR, Schezaro-Ramos R, Collaco RC, Simioni IR, Ramirez D, Gonz   es W, Soares AM, Calderon LA, Marangoni S, Da Silva SL. Exploring and understanding the functional role, and biochemical and structural characteristics of an acidic phospholipase A₂ ApITx-I, purified from *Agkistrodon piscivorus leucostoma* snake venom. Toxicon 2017; 127: 22-36.
- Rodrigues RS, Izidoro LF, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, Selistre-de-Araujo HS, Giglio JR, Fuly AL, Soares AM, Rodrigues VM. Isolation and functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. Toxicon 2007; 50: 153-165.
- Rodrigues VM, Marcussi S, Cambraia RS, De Araujo LA, Malta-Neto LR, Hamaguchi A, Ferro EA, Homs-Brandeburgo MI, Giglio JR, Soares AM. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. Toxicon 2004; 44: 305-314.
- Roberto PG, Kashima S, Marcussi S, Pereira JO, Astolfi-Filho S, Nomizo A, Giglio JR, Fontes MR, Soares AM, and Franca SC. Cloning and Identification of a Complete cDNA Coding for a Bactericidal and Antitumoral Acidic Phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* Venom. The Protein Journal, 2004; 23(4): 273-285
- Roberto RG, Kashima S, Soares AM, Chioato L, Faca VM, Fuly AL, Astolfi-Filho S, Pereira JO and Franca SC. Cloning and expression of an acidic platelet aggregation inhibitor phospholipase A₂ cDNA from *Bothrops jararacussu* venom gland. Protein Expression and Purification 2004; 37: 102-108.

- Rothan HA, The SH, Haron K, Mohamed Z. A Comparative Study on the Expression, Purification and Functional Characterization of Human Adiponectin in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli*. Int. J. Mol. Sci. 2012; 13: 3549-3562.
- Santos-Filho NA, Silveira LB, Oliveira ZC, Bernardes CP, Menaldo DL, Fuly AL, Arantes EC, Sampaio SV, Mamede CC, Beletti ME, De Oliveira F, Soares AM. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inducer phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. Toxicon 2008; 52: 908-917.
- Silveira LB, Marchi-Salvador DP, Santos-Filho NA, Silva FP Jr, Marcussi S, Fuly AL, Nomizo A, da Silva AL, Stabeli RG, Arantes EC, Soares AM. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013; 73: 35-43.
- Scott DL, White SP, Otwinowski Z, Yuan W, Gelb MH, Sigler PB. Interfacial Catalysis: Mechanism of Phospholipase A₂. Science 1990; 250: 1541-1546.
- Saitou N and Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 1987; 4: 406-425.
- Six DA. and Dennis EA. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. Biochimica et Biophysica Acta 2000; 1488: 1-19.
- Schaloske RH, Dennis EA. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. Biochimica et Biophysica Acta 2006; 1761: 1246-1259.
- Teixeira SS, Silveira LB, Da Silva FM, Marchi-Salvador DP, Silva FP Jr, Izidoro LF, Fuly AL, Juliano MA, dos Santos CR, Murakami MT, Sampaio SV,

- da Silva SL, Soares AM. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. *Arch Toxicol* 2011; 85:1219-1233.
- Tschopp JF, Brust PF, Cregg JM, Stillman CA, and Gingeras TR. Expression of the lacZ gene from the two methanol-regulated promoters in *Pichia pastoris*. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3859-3876.
 - Vidal JC and Stoppani AOM. Isolation and Purification of two Phospholipases A from *Bothrops* Venoms. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1971; 145: 543-556.
 - Vargas LJ, Londoño M, Quintana JC, Rua C, Segura C, Lomonte B, Nuñez V. An acidic phospholipase A₂ with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 2012; 161: 341-347.
 - Vieira SM, Goncalves SL, da Costa Neves-Ferreira AG, Almeida RV, Perales J. Heterologous expression of the antimyotoxic protein DM64 in *Pichia pastoris*. *PLOS Negl Trop Dis* 2017; 11(7)
 - Yu X, Li Z, Xia X, Fang H, Zhou C, Chen H. Expression and purification of ancrod, an anticoagulant drug, in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* 2007; 55: 257-261
 - Verheij HM, Volwerk JJ, Jansen EH, Puyk WC, Dijkstra BW, Drenth J, and de Haas GH. Methylation of Histidine-48 in Pancreatic Phospholipase A₂. Role of Histidine and Calcium Ion in the Catalytic Mechanism. *Biochemistry* 1980; 19: 743-750.
 - Yarleque CA. Las serpientes peruanas y sus venenos. UNMSM, 2000.

- Warburg O, and Christian W. Isolierung und Kristallisation des Garungsferments enolase. Biochem. Z. 1941; 310: 384-42.
- White CE, Kempli NM and Komives EA. Expression of highly disulfide-bonded protein in *Pichia pastoris*. Structure 1994; 2 (11): 1003-1005.
- Wu S and Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. BioTechniques 2004; 36:152-154
- Waterhouse ABM, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. Nucleic Acids Res. 2018; 46(W1): W296-W303. Disponible en: <https://swissmodel.expasy.org/interactive>
- Zahrl RJ, Peña DA, Mattanovich D and Gasser B. Systems biotechnology for protein production in *Pichia pastoris*. FEMS 2017; 17.
- Zhang FLD, Cai M, Shen J, Wang Y. Heterologous expression of lipoprotein-associated phospholipase A₂ in different expression systems. Protein Expression and Purification 2006; 48: 300-306.

X. ANEXOS

10.1. Preparación de medios para *Escherichia coli* y *Pichia pastoris*

Medio LB (Luria Bertani) bajo en sal pH 7.5 para *E. coli*.

Componentes	Cantidades	Medio Líquido	Medio sólido
Triptona	10 g	X	X
Extracto de levadura	5 g	X	X
NaCl	5 g	X	X
Ajustar el pH 7.5			
Agar	15 g	----	X
Autoclavar 121 °C por 20 min			
Zeocina™ (concentración final)	25 µg/ml	X	X
Volumen total	1 L	1 L	1 L

Medio YPD para *P. pastoris*

Componentes	Cantidades	Medio de crecimiento	Medio líquido de selección	Medio sólido de selección
Extracto de levadura	10 g	X	X	X
Peptona	20 g	X	X	X
Sorbitol 1.0 M	182.2 g	---	X	X
Agar	20 g	---	---	X
Autoclavar a 121 °C por 20 min				
Dextrosa 20 %	100 mL	X	X	X
Zeocina™ (concentración final)	100 mg/ml	---	X	X
Volumen final	1 L	1 L	1 L	1 L

10.2. Producción de proteínas recombinantes usando a *P. pastoris*.

Proteína	Cantidades	Modo	Origen
α -amilasa	2.5 g/L	Secreción	<i>Bacillus licheniformis</i>
Neurotoxin serotipo A	3 g/L	Intracelular	<i>Clostridium botulinum</i>
Toxina tetanus fregmento C	12 g/L	Intracelular	<i>Clostridium tetani</i>
Lipasa	60 mg/L	Secreción	<i>Rhizopus oryzae</i>
Hidroxinitrilo liasa	22 g/L	intracelular	<i>Hevea brasiliensis</i>
Angiotensina I	160 mg/L	Secreción	<i>D. melanogaster</i>
Lisosima c2	550 mg /L	Secreción	Bovino
B-caseína	1 g/L	Intracelular	Bovino
Acetilcolinesterasa	2 mg/L	Secreción	<i>Bungarus fasciatus</i>
Factor de crecimiento epidermal	450 mg/L	Secreción	Raton
APP dos dominios	24 mg/L	Secreción	Humano
α -NAGAL	11.6 mg/L	Secreción	Humano
CD38	455 mg/L	Secreción	Humano
LIF	17 mg/L	Secreción	Humano
Fibrinógeno	100 mg/L	Secreción	Humano
Fibroblasto collagenasa	2.3 mg/L	Secreción	Humano
Cateosina E gastrica	0.6 mg/L	Secreción	Humano
Sola cadena Fv monoclonal	50 mg/L	Secreción	Humano
Amilasa pancreatica	20 mg/L	Secreción	Humano
Albumina serica	3 g/L	Secreción	Humano
Antígeno superficie virus Hepatitis B	400 mg/L	Intracelular	Virus
HIV-1	20 mg/L	Secreción	Virus
Molecular de adesion a celulas neuronal	50 mg/L	Secreción	Humano
Hirudina	1.5 g/L	Secreción	<i>Hirudo medicinalis</i>
Fosforibulokinasa spinach	0.5 mg/g	Intracelular	Plantas

(*) Adaptado de Cregg *et al.* (2000).

10.3. Guía de principios internacionales para el uso de animales en investigación Biomédica (CIOMS, 1985)

Números	Principios básicos
I	El avance y desarrollo de conocimiento biológico requiere la protección de la salud y de ambos siendo el hombre y animales para la experimentación sobre la vida animal intacto de una amplia variedad de especies.
II	Métodos como modelos matemáticos, simulación computacional y sistema biológicos <i>in vitro</i> deberían ser usados apropiadamente.
III	Los animales de experimentación deben ser tomados solo después de considerar su relevancia para la salud humana o animal y el avance de los conocimientos biológicos
IV	Los animales seleccionados para una experimentación deben ser de una especie apropiada y calidad, y el número mínimo requerido para obtener resultados científicamente válidos
V	Investigadores y otros personal nunca deben dejar de tratar a los animales como sensibles, y debe considerar su cuidado y uso adecuados y evitar o minimizar la incomodidad, angustia o dolor como imperativos éticos
VI	El investigador debe asumir que el procedimiento causaría dolor en humanos sería causado en otras especies de vertebrados, aunque se necesita saber más de la percepción de dolor de los animales
VII	Los procedimientos con animales que pueden causar dolor momentáneo o mínimo o incomodidad deben ser apropiadamente sedados, analgésicos o anestesia con las adecuadas prácticas veterinarias.
VIII	Debe tomarse con anticipación el artículo VII, la decisión debe tomarse con cuidado y los artículos IV, V y VI. Los experimentos no solamente deben ser hechos con el propósito de enseñar o demostrar.
IX	Cuando termine el experimento, los animales que sirvieron deben ser matados sin dolor.
X	Lo mejor posible condición de vida debe ser mantenido para propósitos biomédicos. Normalmente el cuidado de los animales debe ser bajo la supervisión de un veterinario.
XI	La responsabilidad del director del instituto o departamento usando animales de la investigación y personal deben tener la calificación o experiencia para conducir procedimientos con animales. Debe haber una adecuada formación, para el cuidado de los animales y humanos.